Applied Biosystems StepOne™

Real-Time PCR System

Experimentos de cuantificación relativa
y C_T comparativos

Applied Biosystems StepOne™
Real-Time PCR System
Experimentos de cuantificación relativa

Introducción 1
Diseño del experimento de curva estándar relativa 2
Preparación de las reacciones de la curva estándar relativa 3
Realización del experimento de curva estándar relativa 4
Análisis del experimento de curva estándar relativa 5
Diseño del experimento de C_T comparativos 6
Preparación de las reacciones de C_T comparativos 7
Realización del experimento de C_T comparativos 8
Análisis del experimento de C_T comparativos 9

© Copyright 2006, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

NOTICE TO PURCHASER: Label License

The StepOne™ Real-Time PCR System is covered by US patents and corresponding claims in their non-US counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5′ nuclease methods. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

TRADEMARKS:

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express, and VIC are registered trademarks, and FAM, JOE, ROX, StepOne, and TAMRA are trademarks of Applied Biosystems o sus subsidiarias en EE.UU. y/o en algunos otros países.

AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Macintosh is a registered trademark of Apple Computer, Inc.

Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

Número de referencia 4377742 Rev. B
06/2010

Contenido

Prólogo vii

Cómo utilizar esta guía vii
Cómo obtener más información viii
Cómo obtener asistencia técnica x
Convenciones de seguridad utilizadas en este documento xi
Símbolos en los instrumentos xiii
Etiquetas de seguridad en los instrumentos xiv
Seguridad general del instrumento xvi
Seguridad química xvii
Seguridad de residuos químicos xix
Seguridad eléctrica xx
Seguridad de los LED xxi
Seguridad biológica xxi
Seguridad de la estación de trabajo xxii
Estándares de seguridad y compatibilidad electromagnética (EMC) xxiii

Capítulo 1 **Introducción 1**

Acerca del sistema StepOne™ 2
Acerca de los experimentos de cuantificación relativa 4
Cómo utilizar esta guía 9
Acerca del experimento de ejemplo 10
Flujo de trabajo del experimento de ejemplo 12

Capítulo 2 **Diseño del experimento de curva estándar relativa . 15**

Resumen del capítulo 16
Creación de un nuevo experimento 17
Definición de las propiedades del experimento 20
Definición de los métodos y materiales 22
Configuración de los genes diana 25
Configuración de los estándares 28
Configuración de las muestras 30
Configuración de las opciones de cuantificación relativa 32
Configuración del protocolo de termociclado 33
Revisión de la configuración de la reacción 35
Solicitud de materiales para el experimento 43
Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño 46

Capítulo 3 **Preparación de las reacciones de la curva estándar relativa 49**

Resumen del capítulo 50
Preparación del molde 51
Preparación de las diluciones de las muestras 53
Preparación de la dilución seriada 55
Preparación de la mezcla de reacción 58
Preparación de la placa de reacción 61

Capítulo 4 **Realización del experimento de curva estándar relativa 67**

Resumen del capítulo 68
Preparación de la reacción 69
(Opcional) Activación de las notificaciones 71
Inicio de la reacción 73
Monitorización de la reacción 76
Descarga de la placa de reacción y transferencia de datos 87

Capítulo 5 **Análisis del experimento de curva estándar relativa 91**

Resumen del capítulo 92

Sección 5.1: Revisión de los resultados 93
Análisis del experimento 94
Visualización de la curva estándar 100
Revisión de la gráfica de amplificación 103
Revisión de la gráfica de expresión génica y la tabla de pocillos 108
Presentación de los datos 111

Sección 5.2: Solución de problemas 113
Revisión de las opciones de análisis 114
Revisión del resumen QC 116
Omisión de pocillos para el análisis 118
Revisión de la gráfica multicomponente 120
Revisión de la gráfica de datos brutos 122

Capítulo 6 **Diseño del experimento de C_T comparativos 125**

Resumen del capítulo 126
Creación de un nuevo experimento 127
Definición de las propiedades del experimento 129
Definición de los métodos y materiales 131
Configuración de los genes diana 135
Configuración de las muestras 137
Configuración de las opciones de cuantificación relativa 140
Configuración del protocolo de termociclado 141
Revisión de la configuración de la reacción 142
Solicitud de materiales para el experimento 148
Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño 152

Capítulo 7 **Preparación de las reacciones de C_T comparativos 155**

Resumen del capítulo 156
Preparación del molde 157
Preparación de las diluciones de las muestras 158
Preparación de la mezcla de reacción 160
Preparación de la placa de reacción 163

Capítulo 8 **Realización del experimento de C_T comparativos . . 167**

Resumen del capítulo 168
Preparación de la reacción 169
Realización del experimento 171

Capítulo 9 **Análisis del experimento de C_T comparativos 173**

Resumen del capítulo 174

Sección 9.1: Revisión de los resultados 175
Análisis del experimento 176
Revisión de la gráfica de expresión génica y la tabla de pocillos 182
Revisión de la gráfica de amplificación 185
Presentación de los datos 191

Sección 9.2: Solución de problemas 193
Revisión de las opciones de análisis 194
Revisión del resumen QC 196
Omisión de pocillos para el análisis 197
Revisión de la gráfica multicomponente 200
Revisión de la gráfica de datos brutos 203

Apéndice A **Flujos de trabajo alternativos para el experimento 205**

Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) 206
Flujo de trabajo QuickStart (Inicio rápido) 207
Flujo de trabajo de molde 208
Flujo de trabajo de exportación/importación 209

Bibliografía 211

Glosario 213

Índice 227

Prólogo

Cómo utilizar esta guía

Finalidad de esta guía

En esta guía, se explica cómo realizar experimentos de curva estándar relativa y C_T ($\Delta\Delta C_T$) en Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (sistema StepOne™). Esta guía sirve de:

- Tutorial, utilizando los datos de los experimentos de ejemplo que se incluyen en Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software (software StepOne™).
- Guía para realizar sus propios experimentos.

Público

Esta guía está destinada al personal de laboratorio y a los investigadores que realizan experimentos de cuantificación relativa con el sistema StepOne.

Suposiciones

En esta guía, se asume que el usuario:

- Está familiarizado con el sistema operativo Microsoft Windows® XP.
- Está familiarizado con Internet y los navegadores de Internet.
- Sabe cómo manejar muestras de DNA y/o RNA y prepararlas para la PCR.
- Sabe almacenar datos, transferir archivos y copiar y pegar.
- Tiene experiencia con redes si tiene pensado integrar el sistema StepOne en el flujo de datos existente de su laboratorio.

Convenciones del texto

En esta guía, se utilizan las siguientes convenciones:

- **El texto en negrita** indica una acción del usuario. Por ejemplo:

  Escriba **0** y, a continuación, pulse **Intro** en cada uno de los campos restantes.
- *El texto en cursiva* señala palabras nuevas o importantes y también se utiliza para enfatizar algo. Por ejemplo:

  Antes de realizar el análisis, prepare *siempre* una matriz fresca.
- El símbolo de la flecha que apunta a la derecha (▸) separa los comandos sucesivos que se seleccionan en un menú desplegable o un menú de acceso directo. Por ejemplo:

  Seleccione **File** (Archivo) ▸ **Open** (Abrir).

Palabras de aviso para el usuario

En la documentación de Applied Biosystems, aparecen dos palabras de aviso para el usuario. Cada palabra implica un nivel concreto de observación o acción, tal y como se describe a continuación:

Nota: Proporciona información que puede ser interesante o útil, pero no es esencial para el uso del producto.

¡IMPORTANTE! Proporciona información que es necesaria para poder utilizar el instrumento correctamente, para poder utilizar un kit de reactivos con precisión o para poder utilizar un producto químico de manera segura.

A continuación, se muestran algunos ejemplos de palabras de aviso para el usuario:

Nota: La función de calibración también está disponible en la consola de control.

¡IMPORTANTE! Para comprobar la conexión del cliente, necesita un identificador de usuario válido.

Palabras de aviso de seguridad

En la documentación del usuario, también aparecen palabras de aviso de seguridad. Para obtener más información, consulte "Palabras de aviso de seguridad" en la página xi.

Cómo obtener más información

Documentación relacionada

El sistema StepOne incluye la siguiente documentación:

Documento	Núm. ref. inglés	Núm. ref. español
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments	4376786	4377729
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments	4376787	—
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments	4376785	4377742
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments	4376784	4377736
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation, Maintenance, and Networking Guide	4376782	4377798
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Quick Reference Card	4376783	4377792
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Site Preparation Guide	4376768	4378359
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help	—	—

Applied Biosystems puede proporcionarle la siguiente documentación auxiliar:

Documento	Número de referencia
Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note	127AP05
Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol	4375575
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Performance Verification Protocol	4376791
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Qualification-Operation Qualification Protocol	4376790
Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Planned Maintenance Protocol	4376788
Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol	4334429
Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide	4362460
TaqMan® Gene Expression Assays Protocol	4333458
User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression	4303859

Nota: Para obtener más documentación, consulte "Cómo obtener asistencia técnica" en la página x.

Obtención de información de la ayuda del software

La ayuda del software StepOne describe cómo se utiliza cada función de la interfaz de usuario. Para acceder a la ayuda desde el software StepOne, realice una de las siguientes acciones:

- Pulse **F1**.
- Haga clic en en la barra de herramientas.
- Seleccione **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Para buscar temas de interés en la ayuda:

- Consulte el índice de contenido.
- Busque un tema específico.
- Busque en un índice alfabético.

Envíenos sus comentarios

Applied Biosystems agradece sus comentarios y sugerencias para mejorar sus documentos de usuario. Puede enviar sus comentarios a la dirección de correo electrónico:

techpubs@appliedbiosystems.com

¡IMPORTANTE! Esta dirección sólo sirve para enviar comentarios y sugerencias en relación con la documentación. Para solicitar documentos, descargar archivos PDF u obtener ayuda sobre una cuestión técnica, vaya a **www.appliedbiosystems.com** y, a continuación, haga clic en el vínculo **Support** (Asistencia técnica). (Consulte "Cómo obtener asistencia técnica" más adelante).

Cómo obtener asistencia técnica

Para acceder a los servicios más recientes y obtener información acerca de la asistencia técnica, vaya a **www.appliedbiosystems.com** y, a continuación, haga clic en el vínculo **Support** (Asistencia técnica).

En la página Support (Asistencia técnica), puede:

- Buscar las preguntas más frecuentes (FAQ)
- Enviar una pregunta directamente al Servicio de asistencia técnica
- Solicitar a Applied Biosystems documentos de usuario, fichas técnicas de solicitud de materiales (MSDS), certificados de análisis y otros documentos relacionados
- Descargar documentos PDF
- Obtener información acerca de la formación del cliente
- Descargar actualizaciones y parches de software

Asimismo, en la página Support (Asistencia técnica) podrá acceder a los números de teléfono y fax para ponerse en contacto con el Servicio de asistencia técnica y las instalaciones de venta de Applied Biosystems en todo el mundo.

¡IMPORTANTE! Cuando se le solicite que lo haga en esta guía o cuando tenga que programar el mantenimiento del instrumento StepOne™ (por ejemplo, el mantenimiento anual planificado o la verificación/calibración de la temperatura), póngase en contacto con el Centro de atención al cliente de Applied Biosystems. Para obtener un número de teléfono o enviar un mensaje de correo electrónico al centro, visite **http://www.appliedbiosystems.com/support/contact**.

Convenciones de seguridad utilizadas en este documento

Palabras de aviso de seguridad

En la documentación del usuario de Applied Biosystems, aparecen cuatro palabras de aviso de seguridad en los puntos del documento en los que debe conocer la existencia de peligros importantes. Cada palabra de aviso (**IMPORTANTE, PRECAUCIÓN, ADVERTENCIA, PELIGRO**) implica un nivel de observación o acción particular, tal y como se explica a continuación.

Definiciones

¡IMPORTANTE! Proporciona información que es necesaria para poder utilizar el instrumento correctamente, para poder utilizar un kit de reactivos con precisión o para poder utilizar un producto químico de manera segura.

Indica una situación potencialmente peligrosa que, de no evitarse, podría causar lesiones leves o moderadas. También puede utilizarse para alertar de prácticas no seguras.

Indica una situación potencialmente peligrosa que, de no evitarse, podría causar lesiones graves o mortales.

Indica una situación inminentemente peligrosa que, de no evitarse, tendrá como resultado lesiones graves o mortales. Esta palabra de aviso se limita a las situaciones más extremas.

A excepción de los avisos IMPORTANTE, todas las palabras de aviso de seguridad de un documento de Applied Biosystems aparecen con la figura de un triángulo abierto que contiene un símbolo de peligro. Estos símbolos de peligro son idénticos a los que se incorporan en los instrumentos de Applied Biosystems (consulte "Símbolos de seguridad" en la página xiii).

Ejemplos

¡IMPORTANTE! Debe crear una hoja de cálculo de entradas de las muestras diferente para cada placa de 96 pocillos.

PELIGRO QUÍMICO. **TaqMan® Universal PCR Master Mix** puede causar irritaciones en la piel y los ojos. Puede provocar molestias si se ingiere o se inhala. Consulte la ficha técnica de seguridad (MSDS) y siga las instrucciones de manipulación indicadas. Use protectores oculares, vestimenta protectora y guantes apropiados.

PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS. Durante el uso de los instrumentos, la cubierta caliente y el bloque, se pueden alcanzar temperaturas superiores a 100 °C.

PELIGRO ELÉCTRICO. La continuidad del circuito de toma a tierra es vital para la seguridad. Jamás utilice el sistema con el conductor de toma de tierra desconectado.

Símbolos en los instrumentos

Electricidad Símbolos en los instrumentos

En la siguiente tabla, se describen los símbolos eléctricos que pueden aparecer en los instrumentos de Applied Biosystems.

Símbolo	Descripción
	Indica la posición **On** (Encendido) del interruptor de encendido principal.
	Indica la posición **Off** (Apagado) del interruptor de encendido principal.
	Indica un interruptor de espera por medio del cual se activa la posición **Standby** (Espera) en el instrumento. Si este interruptor está en la posición de espera, puede haber peligro de tensión.
	Indica la posición **On/Off** (Encendido/Apagado) de un interruptor de encendido principal de contrafase.

Símbolo	Descripción
	Indica un terminal que puede estar conectado a la referencia del retorno de tierra del circuito de señal de otro instrumento. No es un terminal de tierra protegido.
	Este símbolo indica que se debe conectar a tierra un terminal de toma a tierra de protección antes de realizar ninguna otra conexión eléctrica en el instrumento.
	Indica que un terminal puede recibir o suministrar tensión o corriente alterna.
	Indica que un terminal puede recibir o suministrar tensión o corriente alterna o continua.

Símbolos de seguridad

En la siguiente tabla, se describen los símbolos de seguridad que pueden aparecer en los instrumentos de Applied Biosystems. Estos símbolos pueden aparecer en solitario o con un texto que explique el peligro correspondiente (consulte "Etiquetas de seguridad en los instrumentos" en la página xiv). Estos símbolos de seguridad también pueden aparecer junto a PELIGROS, ADVERTENCIAS y PRECAUCIONES que se incluyen en el texto de este o de otros documentos de ayuda de productos.

Símbolo	Descripción
	Indica que debería consultar el manual para obtener más información y proceder con el cuidado correspondiente.
	Indica la presencia de una superficie caliente u otro peligro debido a altas temperaturas y recomienda proceder con el cuidado correspondiente.

Símbolo	Descripción
	Indica la presencia de piezas móviles y recomienda proceder con el cuidado correspondiente.
	Indica la presencia de un peligro de descarga eléctrica y recomienda proceder con el cuidado correspondiente.
	Indica la presencia de un láser en el interior del instrumento y recomienda proceder con el cuidado correspondiente.

Medio ambiente Símbolos en los instrumentos

El siguiente símbolo se aplica a todos los productos eléctricos y electrónicos de Applied Biosystems que salieron al mercado europeo después del 13 de agosto de 2005.

Símbolo	Descripción
	No tire este producto a la basura municipal normal. Cumpla las ordenanzas municipales sobre residuos correspondientes para reducir el impacto medioambiental de los residuos de equipos eléctricos y electrónicos (WEEE). **Clientes de la Unión Europea:** Llame a la oficina de atención al cliente local de Applied Biosystems para informarse sobre la recogida de equipos y el reciclaje. Consulte en **http://www.appliedbiosystems.com** un listado de oficinas de atención al cliente de la Unión Europea.

Etiquetas de seguridad en los instrumentos

Los siguientes símbolos de PRECAUCIÓN, ADVERTENCIA y PELIGRO pueden aparecer en los instrumentos de Applied Biosystems en combinación con los símbolos de seguridad que se han descrito en la sección anterior.

Inglés	Francés
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	**ATTENTION** Produits chimiques dangeureux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels avant la manipulation des produits.
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	**ATTENTION** Déchets dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels et la régulation locale associées à la manipulation et l'élimination des déchets.
CAUTION Hot surface.	**ATTENTION** Surface brûlante.
DANGER High voltage.	**DANGER** Haute tension.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	**AVERTISSEMENT** Pour éviter les risques d'électrocution, ne pas retirer les capots dont l'ouverture nécessite l'utilisation d'outils. L'instrument ne contient aucune pièce réparable par l'utilisateur. Toute intervention doit être effectuée par le personnel de service qualifié de Applied Biosystems.
CAUTION Moving parts.	**ATTENTION** Parties mobiles.
DANGER Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	**DANGER** Rayonnement visible ou invisible d'un faisceau LED de Classe 3B (III) en cas d'ouverture et de neutralisation des dispositifs de sécurité. Evitez toute exposition au faisceau.

Ubicaciones de los símbolos de advertencia

El sistema StepOne contiene una advertencia en el lugar que se indica a continuación:

Seguridad general del instrumento

PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS. Si el instrumento se utiliza de alguna forma que no especifica Applied Biosystems, se pueden producir lesiones personales o daños en el instrumento.

Movimiento y levantamiento del instrumento

PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS. El instrumento sólo puede moverlo y colocarlo el personal o el distribuidor que se especifique en la guía de preparación del emplazamiento correspondiente. Si decide levantar o mover el instrumento después de instalarlo, no intente hacerlo sin la ayuda de otras personas, el equipo de traslado adecuado y las técnicas de elevación correctas. El levantamiento inapropiado puede causar dolorosas lesiones dorsales, que pueden resultar permanentes. Dependiendo del peso, se podrían necesitar dos personas para mover o levantar un instrumento.

Movimiento y levantamiento de ordenadores y monitores autónomos

No intente levantar o mover el ordenador ni el monitor sin la ayuda de otras personas. Dependiendo del peso del ordenador y/o el monitor, se podrían necesitar dos o más personas para moverlos.

Aspectos a tener en cuenta antes de levantar el ordenador y/o el monitor:

- Asegúrese de sujetar el ordenador o el monitor de un lugar seguro y cómodo para levantarlos.
- Asegúrese de que no hay ningún obstáculo entre el lugar en el que se encuentra el objeto y su lugar de destino.
- No levante un objeto a la vez que gira el torso.
- Mantenga la columna espinal en una posición neutral mientras levanta el objeto con las piernas.
- Los participantes deben coordinar las labores de levantamiento y movimiento antes de realizarlas.
- En lugar de levantar el objeto desde la caja del embalaje, incline cuidadosamente la caja hacia un lado y manténgala fija mientras alguien desliza su contenido hacia fuera.

Uso del instrumento

Asegúrese de que todas las personas que utilicen el instrumento:

- Han recibido instrucciones sobre prácticas de seguridad generales para laboratorios y prácticas de seguridad generales para el instrumento.
- Lea y comprenda todas las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS) aplicables. Consulte "Acerca de las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS)" en la página xvii.

Limpieza o descontamina-ción del instrumento

Antes de utilizar un método de limpieza o descontaminación que no sea el que recomienda el fabricante, consulte al fabricante para comprobar que el método propuesto no va a dañar el equipo.

Seguridad química

Advertencia de peligro químico

ADVERTENCIA **PELIGRO QUÍMICO.** Antes de manejar algún producto químico, consulte la ficha técnica de seguridad de los materiales (MSDS) que suministra el fabricante y observe todas las precauciones relevantes.

ADVERTENCIA **PELIGRO DE ALMACENAMIENTO QUÍMICO.** No recoja ni almacene nunca los residuos en un envase de cristal, pues corre el riesgo de que se rompa o se resquebraje. Las botellas de reactivos y de residuos pueden agrietarse y presentar fugas. Cada botella de residuos deberá asegurarse en un recipiente de seguridad de polietileno de baja densidad con la tapa fija y las asas bloqueadas en posición vertical. Utilice la protección ocular, la vestimenta y los guantes adecuados cuando manipule botellas de reactivos o de residuos.

Directrices de seguridad química

Para reducir al mínimo el peligro de los productos químicos:

- Lea y comprenda las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS) que proporciona el fabricante de los productos químicos antes de almacenar, manipular o trabajar con cualquier producto químico o material peligroso. (Consulte "Acerca de las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS)" en la página xvii.)
- Minimice el contacto con productos químicos. Utilice un equipo adecuado de protección personal durante la manipulación de productos químicos (por ejemplo, protectores oculares, guantes o vestimenta protectora). Puede encontrar más normas de seguridad en las MSDS.
- Minimice la inhalación de productos químicos. No deje abiertos los recipientes de productos químicos. Utilícelos únicamente con la ventilación adecuada (por ejemplo, una campana extractora). Puede encontrar más normas de seguridad en las MSDS.
- Compruebe periódicamente la ausencia de fugas o salpicaduras. Si se produce una fuga o un derrame, siga los procedimientos de limpieza del fabricante, tal y como se recomienda en la MSDS.
- Cumpla todas las leyes y normativas locales, estatales/provinciales o nacionales en materia de almacenamiento, manipulación y eliminación de productos químicos.

Acerca de las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS)

Los fabricantes de productos químicos incluyen fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS) con los productos químicos peligrosos que envían a sus clientes *nuevos*. También incluyen MSDS con el primer envío de un producto químico peligroso a un cliente después de que esa MSDS se haya actualizado. En las MSDS, encontrará la información de seguridad necesaria para almacenar, manipular, transportar y desechar los productos químicos de forma segura.

Cada vez que reciba una MSDS nueva con un producto químico peligroso, no se olvide de reemplazar la MSDS correspondiente en sus archivos.

Obtención de MSDS

Las MSDS de cualquier producto químico de Applied Biosystems están a su disposición de manera gratuita las 24 horas del día. Para obtener MSDS:

1. Vaya a **https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html**
2. En el campo de búsqueda de la página de búsqueda de MSDS:
   a. Escriba el nombre del producto químico, el número de serie u otra información de interés que espere que aparezca en la MSDS.
   b. Seleccione el idioma que desee.
   c. Haga clic en **Search** (Buscar).
3. Para ver, descargar o imprimir el documento que le interesa:
   a. Haga clic con el botón derecho en el título del documento.
   b. Seleccione:
      - **Open** (Abrir): para ver el documento.
      - **Save Target As** (Guardar destino como): para descargar una versión PDF del documento en el destino que seleccione.
      - **Print Target** (Imprimir destino): para imprimir el documento.
4. Para enviar una copia de una MSDS por fax o correo electrónico, en la página de resultados de la búsqueda:
   a. Seleccione **Fax** o **Email** bajo el título del documento.
   b. Haga clic en **RETRIEVE DOCUMENTS** (Recuperar documentos) al final de la lista de documentos.
   c. Introduzca la información requerida.
   d. Haga clic en **View/Deliver Selected Documents Now** (Ver/enviar ahora los documentos seleccionados).

Nota: Para obtener las MSDS de productos químicos que no distribuye Applied Biosystems, póngase en contacto con el fabricante del producto químico.

Seguridad de residuos químicos

Peligro de residuos químicos

RESIDUOS PELIGROSOS. Para obtener información acerca de su manipulación y eliminación, consulte las fichas técnicas de seguridad de los materiales y las normativas locales.

PELIGRO DE RESIDUOS QUÍMICOS. Los residuos producidos por los instrumentos de Applied Biosystems son potencialmente peligrosos y pueden causar lesiones, enfermedades o la muerte.

PELIGRO DE ALMACENAMIENTO QUÍMICO. No recoja ni almacene nunca los residuos en un envase de cristal, pues corre el riesgo de que se rompa o se resquebraje. Las botellas de reactivos y de residuos pueden agrietarse y presentar fugas. Cada botella de residuos deberá asegurarse en un recipiente de seguridad de polietileno de baja densidad con la tapa fija y las asas bloqueadas en posición vertical. Utilice la protección ocular, la vestimenta y los guantes adecuados cuando manipule botellas de reactivos o de residuos.

Directrices de seguridad de residuos químicos

Para reducir al mínimo el peligro de los residuos químicos:

- Lea y comprenda las fichas técnicas de seguridad de los materiales (MSDS) proporcionadas por los fabricantes de los productos químicos en el recipiente de residuos antes de almacenar, manipular o eliminar los residuos químicos.
- Disponga de contenedores de residuos principales y secundarios. (Los contenedores principales contienen los residuos inmediatos. Los contenedores secundarios contienen cualquier derrame o fuga del contenedor principal. Ambos contenedores deben ser compatibles con el material de residuo y deben cumplir los requisitos federales, estatales y locales sobre el almacenamiento en contenedores).
- Minimice el contacto con productos químicos. Utilice un equipo adecuado de protección personal durante la manipulación de productos químicos (por ejemplo, protectores oculares, guantes o vestimenta protectora). Puede encontrar más normas de seguridad en las MSDS.
- Minimice la inhalación de productos químicos. No deje abiertos los recipientes de productos químicos. Utilícelos únicamente con la ventilación adecuada (por ejemplo, una campana extractora). Puede encontrar más normas de seguridad en las MSDS.
- Manipule los residuos químicos bajo una campana extractora.
- Después de vaciar el recipiente de residuos, ciérrelo bien con la tapa suministrada.
- Elimine el contenido de la bandeja de residuos y de la botella de residuos conforme a las buenas prácticas de laboratorio y a la normativa local, estatal/provincial o nacional en materia de medio ambiente y salud.

Eliminación de residuos

Si se generan residuos potencialmente peligrosos al utilizar el instrumento, debe:

- Identificar (mediante análisis, si es necesario) los residuos generados por las aplicaciones, los reactivos y los sustratos utilizados en su laboratorio.
- Garantizar la salud y la seguridad de todo el personal de su laboratorio.
- Garantizar que los residuos producidos por el instrumento se almacenan, transfieren, transportan y eliminan de acuerdo con todas las normativas locales, estatales/provinciales y/o nacionales.

¡IMPORTANTE! Los materiales radiactivos o que impliquen un peligro biológico pueden requerir una manipulación especial, pudiéndose aplicar limitaciones en materia de eliminación.

Seguridad eléctrica

PELIGRO DE DESCARGA ELÉCTRICA. Se puede producir una descarga eléctrica grave si se utiliza el sistema StepOne sin haber colocado los paneles del instrumento. No quite los paneles del instrumentos. Los contactos de alta tensión quedan expuestos al quitar estos paneles del instrumento.

Fusibles

PELIGRO DE INCENDIO. El uso de fusibles o de una fuente de alimentación de alta tensión incorrectos puede dañar el sistema de cableado del instrumento y provocar un incendio. Antes de encender el instrumento, compruebe que los fusibles están bien instalados y que la tensión del instrumento se corresponde con la fuente de alimentación del laboratorio.

PELIGRO DE INCENDIO. Para protegerse contra el riesgo de incendio, sólo cambie los fusibles por otros que sean del tipo y la potencia que se especifica para el instrumento.

Alimentación eléctrica

PELIGRO ELÉCTRICO. La continuidad del circuito de toma de tierra es vital para la seguridad del equipo. Jamás utilice el equipo con el conductor de toma de tierra desconectado.

PELIGRO ELÉCTRICO. Utilice cordones eléctricos certificados y bien configurados para el suministro eléctrico de la instalación.

PELIGRO ELÉCTRICO. Enchufe el sistema a una toma eléctrica que tenga una toma de tierra adecuada y la capacidad de corriente apropiada.

Potencia de sobretensión

El sistema StepOne se incluye en la categoría II (de sobretensión) de las instalaciones y está clasificado como un equipo portátil.

Seguridad de los LED

Para garantizar un funcionamiento seguro de los LED:

- Un representante de Applied Biosystems debe realizar el mantenimiento del sistema.
- Todos los paneles del instrumentos deben estar colocados en el instrumento mientras éste está en funcionamiento. Cuando todos los paneles están instalados, no se detecta ninguna radiación. Si se quita algún panel cuando el LED está en funcionamiento (durante una reparación con los interbloqueos de seguridad desactivados), podría exponerse a emisiones LED superiores a la potencia de la clase **3B**.
- No quite las etiquetas de seguridad ni desactive los interbloqueos de seguridad.

Seguridad biológica

Peligro biológico general

PELIGRO BIOLÓGICO. Las muestras biológicas como, por ejemplo, de tejidos, fluidos corporales, agentes infecciosos y sangre humana o de otros animales, pueden transmitir enfermedades infecciosas. Siga todas las normativas locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables. Lleve el equipo de protección adecuado, lo que incluye, entre otras cosas: protección ocular, protección facial, vestimenta/bata de laboratorio y guantes. Todo el trabajo se debe realizar en instalaciones que dispongan del equipamiento adecuado y con el equipo de seguridad apropiado (por ejemplo, dispositivos de contención física). Los trabajadores deberían recibir formación de acuerdo con los requisitos de la institución o empresa y los requisitos legales aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos. Lea y siga las directrices y/o los requisitos legales aplicables en:

- Las directrices del Departamento de Salud y Servicios Humanos (Department of Health and Human Services) de EE.UU. publicadas en *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (nº 017-040-00547-4; **http://bmbl.od.nih.gov**)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR§1910.1030; **http://www.access.gpo.gov/ nara/cfr/waisidx_01/ 29cfr1910a_01.html**).
- Los protocolos del programa de seguridad biológica de su empresa o institución para trabajar o manipular materiales potencialmente infecciosos.

Puede encontrar más información acerca de las directrices sobre peligros biológicos en:

http://www.cdc.gov

Seguridad de la estación de trabajo

Si configura correctamente la ergonomía de su estación de trabajo, puede reducir o evitar problemas de fatiga, dolor y tensión. Para minimizar o eliminar estos problemas, configure la estación de trabajo para adoptar posiciones neutrales o relajadas cuando esté trabajando.

PELIGRO MUSCULOESQUELÉTICO Y POR MOVIMIENTOS REPETITIVOS. Estos peligros están causados por posibles factores de riesgo, incluidos, entre otros, movimientos repetitivos, posturas incómodas, esfuerzos, mantenimiento de posturas estáticas poco saludables, presión por contacto y otros factores medioambientales de la estación de trabajo.

Para minimizar los riesgos musculoesqueléticos y por movimientos repetitivos:

- Utilice equipos en los que pueda colocarse cómodamente en posiciones neutrales y que permitan acceder de manera adecuada al teclado, el monitor y el ratón.
- Coloque el teclado, el ratón y el monitor de forma que pueda adoptar una postura relajada de la cabeza y el cuerpo.

Estándares de seguridad y compatibilidad electromagnética (EMC)

Estándares de seguridad de EE.UU. y Canadá

El sistema StepOne ha sido probado y cumple el estándar:

UL 61010A-1/CAN/CSA C22.2 No. 1010.1-92, “Requisitos de seguridad de equipos eléctricos para la medición, el control y el uso en laboratorios, Primera parte: Requisitos Generales”.

UL 61010A-2-010/CAN/CSA 1010.2.010, “Requisitos particulares de equipos de laboratorio para el calentamiento de materiales”.

“Estándar de rendimiento 21 CFR 1040.10 y 1040.11 de la Ley de control de radiaciones para la salud y la seguridad de 1968” de la FDA, de la forma que sea aplicable.

Estándar EMC canadiense

Este instrumento ha sido probado y cumple la edición 3 del estándar ICES-001: “Generadores de frecuencias de radio industriales, científicas y médicas”.

Estándares de seguridad y EMC europeos

Seguridad

Este instrumento cumple los requisitos de seguridad europeos (Directiva de baja tensión 73/23/EEC). Este instrumento ha sido probado y cumple los estándares EN 61010-1:2001, “Requisitos de seguridad de equipos eléctricos para la medición, el control y el uso en laboratorios, Primera parte: Requisitos Generales”.

EN 61010-2-010, “Requisitos particulares de equipos de laboratorio para el calentamiento de materiales”.

EN 61010-2-081, “Requisitos particulares para equipos de laboratorio automáticos y semiautomáticos para análisis y otras finalidades”.

EN 60825-1, “Seguridad frente a las radiaciones de los productos láser, clasificación de los equipos, requisitos y guía del usuario”.

EMC

Este instrumento cumple los requisitos de emisiones e inmunidad europeos (Directiva EMC 89/336/EEC). Este instrumento ha sido probado y cumple los estándares EN 61326 (Grupo 1, Clase B) “Equipos eléctricos para la medición, el control y el uso en laboratorios: requisitos EMC”.

Estándares EMC australianos

Este instrumento ha sido probado y cumple el estándar AS/NZS 2064, “Medición de límites y métodos de características de perturbaciones electromagnéticas de equipos de radiofrecuencia industriales, científicos y médicos (ISM)”.

1 Introducción

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Acerca del sistema StepOne™ 2
- Acerca de los experimentos de cuantificación relativa. 4
- Cómo utilizar esta guía 9
- Acerca del experimento de ejemplo 10
- Flujo de trabajo del experimento de ejemplo 12

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Acerca del sistema StepOne™

Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (sistema StepOne™) utiliza reactivos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) basados en fluorescencias para proporcionar:

- Detección cuantitativa de las secuencias de ácidos nucléicos de interés (dianas) mediante análisis a tiempo real.
- Detección cualitativa de secuencias de ácidos nucléicos de interés (dianas) mediante análisis de punto final y curva de disociación.

Acerca de la recogida de datos

El sistema StepOne recoge datos de fluorescencia brutos en diferentes puntos de una PCR, dependiendo del tipo de reacción que realice:

Tipo de proceso		Punto de recogida de datos
Procesos a tiempo real	Curva estándar	El instrumento recoge datos después de cada paso de extensión de la PCR.
	Curva estándar relativa	
	C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$)	
Procesos a punto final	Genotipado	El instrumento recoge datos antes y después de la PCR. En los experimentos de genotipado, el software StepOne™ también puede recoger datos durante la reacción (tiempo real), que pueden resultar de ayuda para solucionar problemas.
	Presencia/ausencia	El instrumento recoge datos antes y después de la PCR.

Con independencia del tipo de reacción que se realice, un punto de recogida de datos o una *lectura* consta de tres fases:

1. **Excitación:** el instrumento StepOne™ ilumina todos los pocillos de la placa de reacción para excitar los fluorocromos correspondientes.
2. **Emisión:** la óptica del instrumento StepOne recoge la fluorescencia residual emitida en todos los pocillos de la placa de reacción. La imagen resultante captada por el dispositivo sólo consta de la luz emitida en un estrecho rango de longitudes de onda.
3. **Recogida:** el instrumento StepOne crea una representación digital de la fluorescencia residual recogida en un intervalo fijo de tiempo. El software StepOne almacena el dato bruto de la imagen fluorescente para analizarlo. Si fuera necesario, el software realizaría lecturas adicionales si lo requirieran los reactivos fluorescentes utilizados en el experimento.

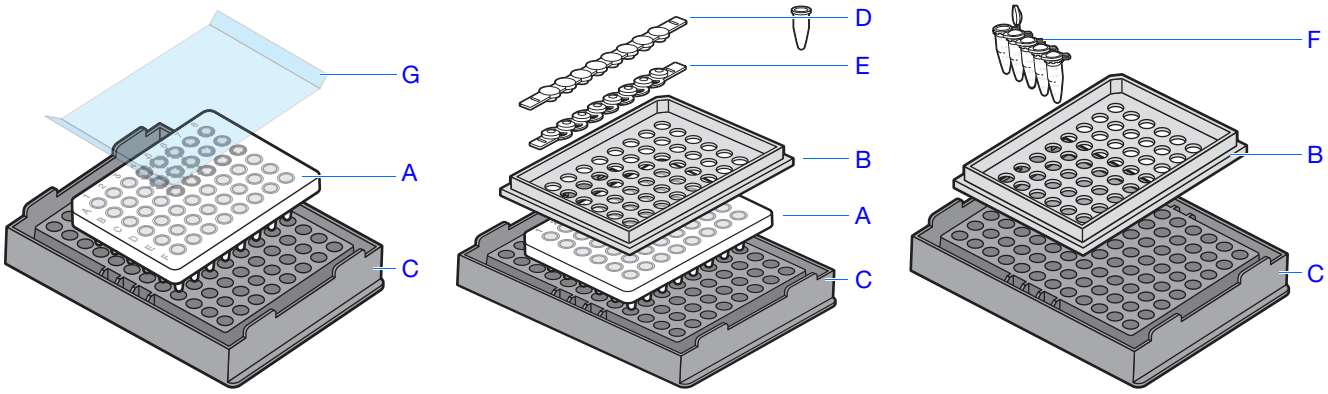
Después de una reacción, el software StepOne utiliza datos de calibración (espacial, espectral y de ruido de fondo) para determinar la ubicación y la intensidad de las señales fluorescentes en cada lectura, el fluorocromo asociado a cada señal fluorescente y el significado de la señal.

Notas

Consumibles admitidos

El sistema StepOne admite los consumibles que se enumeran a continuación. Estos consumibles se utilizan tanto para reacciones en modo estándar como en modo rápido.

Consumible	Número de referencia
• MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates • MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film	• 4375816 • 4375323
• MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips • MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips	• 4358293 • 4323032
• MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps	• 4358297
• MicroAmp™ Fast 48-Well Trays • MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor • MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base	• 4375282 • 4375284 • 4312063



#	Consumible
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps
G	MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Film

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- El sistema StepOne, consulte *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help*.

  Nota: Para acceder a la ayuda, seleccione **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne) desde el software StepOne.

- Experimentos de cuantificación absoluta, consulte *Guía de introducción a Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System para experimentos de curva estándar.*
- Experimentos de genotipado, consulte *Guía de introducción a Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System para experimentos de genotipado*.
- Experimentos de presencia/ausencia, consulte *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.

Acerca de los experimentos de cuantificación relativa

Experimentos de PCR a tiempo real

Los experimentos de cuantificación relativa son experimentos de PCR a tiempo real. En los experimentos de PCR a tiempo real:

- El instrumento monitoriza el progreso de la PCR mientras se produce (Kwok y Higuchi, 1989).
- Se recogen datos durante la reacción de PCR.
- Las reacciones se caracterizan por el ciclo en el que se detecta por primera vez la amplificación de un gen diana (Saiki *et al.*, 1985).

Nota: En esta guía, el término *experimento* se refiere a todo el proceso del experimento, desde su diseño hasta el análisis de los datos.

Acerca de los experimentos de curva estándar relativa

Los experimentos de curva estándar relativa determinan el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen en una muestra de referencia. Para conseguir los resultados, se utiliza una curva estándar construida a partir de una dilución seriada de una muestra de concentración conocida.

Los experimentos de curva estándar relativa se suelen utilizar para:

- Comparar niveles de expresión de un gen en diferentes tejidos.
- Comparar los niveles de expresión de un gen en una muestra tratada y en una muestra no tratada.
- Comparar los niveles de expresión de alelos de tipo salvaje y alelos mutados.

Componentes

Estos son los componentes que se necesitan para preparar las reacciones de PCR para los experimentos de curva estándar relativa:

- **Muestra:** la muestra en la que la cantidad del gen diana es desconocida.

Notas

- **Muestra de referencia:** la muestra utilizada como referencia para los resultados de la comparación. Por ejemplo, en un estudio sobre los efectos de las drogas en la expresión génica, un control no tratado sería una muestra de referencia apropiada.
- **Estándar:** una muestra de concentración conocida.
- **Dilución seriada:** un conjunto de diluciones del estándar (por ejemplo, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) que se utilizan para construir una curva estándar. En todas las muestras, la cantidad del gen diana se determina realizando una interpolación a partir de la curva estándar y luego dividiendo por la cantidad del gen diana de la muestra de referencia. Dado que la muestra de referencia es la muestra 1×, todas las demás cantidades se expresan como una diferencia multiplicada por *n* relativa a ella. Asimismo, la unidad de la curva estándar se cancela porque la cantidad de muestra se divide por la cantidad de muestra de referencia. Por consiguiente, lo único que se necesita de los estándares es conocer sus diluciones relativas. Por lo tanto, se puede utilizar cualquier cDNA, RNA o DNA de la solución de partida que contenga el gen diana apropiado para preparar los estándares.
- **Control endógeno:** un gen presente en un nivel de expresión uniforme en todas las muestras. El control endógeno sirve para normalizar posibles variaciones de la cantidad de cDNA que se añade a cada reacción que se producen a consecuencia de imprecisiones en el pipeteo.
- **Réplicas:** reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos.
- **Controles negativos:** muestras que contienen agua o tampón en lugar de un molde. En los controles negativos no debería haber amplificación.

Acerca de los experimentos de C_T comparativos

Los experimentos de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) determinan el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen en una muestra de referencia. Para obtener los resultados, se utilizan fórmulas aritméticas.

Los experimentos de C_T comparativos se suelen utilizar para:

- Comparar niveles de expresión de un gen en diferentes tejidos.
- Comparar los niveles de expresión de un gen en una muestra tratada y en una muestra no tratada.
- Comparar los niveles de expresión de alelos de tipo salvaje y alelos mutados.

Componentes

Estos son los componentes que se necesitan para preparar las reacciones de PCR para los experimentos de C_T comparativos:

- **Muestra:** la muestra en la que la cantidad del gen diana es desconocida.
- **Muestra de referencia:** la muestra utilizada como referencia para los resultados de la comparación. Por ejemplo, en un estudio sobre los efectos de las drogas en la expresión de los genes, un control no tratado sería una muestra de referencia apropiada.
- **Control endógeno:** un gen presente en un nivel de expresión uniforme en todas las muestras. El control endógeno sirve para normalizar posibles variaciones de la cantidad de cDNA que se añade a cada reacción que se producen a consecuencia de imprecisiones en el pipeteo.

Notas

- **Réplicas:** reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos.
- **Controles negativos:** muestras que contienen agua o tampón en lugar de un molde. En los controles negativos no debería haber amplificación.

Experimentos de curva estándar relativa y experimentos de C_T comparativos

Tenga en cuenta lo siguiente a la hora de elegir entre experimentos de curva estándar relativa y experimentos de C_T comparativos:

Tipo de experimento	Descripción	Ventaja	Limitación
Curva estándar relativa	Se utiliza una curva estándar para determinar el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen diana en una muestra de referencia. Es ideal para los ensayos que tienen una eficiencia de PCR por debajo de la óptima.	Es el experimento que requiere menos validación, porque las eficiencias de PCR del gen diana y el control endógeno no tienen que ser equivalentes.	Se debe crear una curva estándar para cada gen diana, lo que exige más reactivos y más espacio en la placa de reacción.
C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$)	Se utilizan fórmulas aritméticas para determinar el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen diana en una muestra de referencia. Es ideal para analizar la expresión relativa de muchos genes de interés en un gran número de muestras.	• Los niveles relativos de expresión de un gen diana en las muestras se pueden determinar sin utilizar una curva estándar, siempre que las eficiencias de PCR del gen diana y el control endógeno sean relativamente equivalentes. • Menor uso de reactivos. • Más espacio disponible en la placa de reacción.	• Los ensayos que no son óptimos (con una eficiencia de PCR baja) pueden producir resultados imprecisos. • Antes de utilizar el método de C_T comparativos, Applied Biosystems recomienda determinar si las eficiencias de PCR del ensayo diana y el ensayo de control endógeno son aproximadamente iguales.

Opciones de la PCR

Al realizar una PCR a tiempo real, puede elegir entre:

- PCR en singleplex y en multiplex (más abajo)

  y

- RT-PCR de 1 y 2 pasos (página 7)

Notas

PCR en singleplex y PCR en multiplex

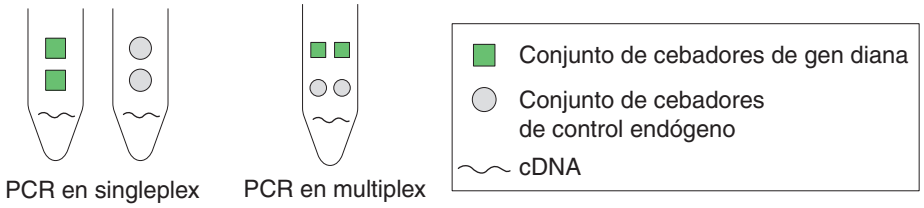
Se puede realizar una reacción de PCR como una:

- Reacción en singleplex, donde sólo hay un ensayo en el tubo de reacción o pocillo. Sólo se puede amplificar un gen diana o un control endógeno por reacción.

  o

- Reacción en multiplex, donde hay dos o más ensayos en el tubo de reacción o pocillo. Cada conjunto amplifica un gen diana o un control endógeno específicos.

¡IMPORTANTE! No se pueden utilizar reactivos SYBR® Green para las reacciones en multiplex.



RT-PCR de 1 y de 2 pasos

Se puede realizar una retrotranscripción (RT) y una PCR en una sola reacción (1 paso) o en reacciones distintas (2 pasos). Los reactivos que se utilicen dependerán de si va a realizar una RT-PCR de 1 o de 2 pasos:

- En las RT-PCR de 1 paso, la RT y la PCR se producen en un sistema de tampón, que permite disponer de un solo tubo para la amplificación de la RT y la PCR. Sin embargo, no se puede utilizar una mezcla maestra de PCR rápida ni la enzima de prevención de contaminación cruzada, AmpErase® UNG (uracil-N-glucosilasa), para realizar la RT-PCR de 1 paso.
- La RT-PCR de 2 pasos se realiza en dos reacciones distintas: En primer lugar, el RNA total se retrotranscribe a cDNA y, a continuación, el cDNA se amplifica por medio de la PCR. Este método es útil para generar un pool de cDNAs o para almacenar alícuotas de cDNA y utilizarlas posteriormente. La enzima AmpErase® UNG se puede utilizar para evitar la contaminación cruzada.

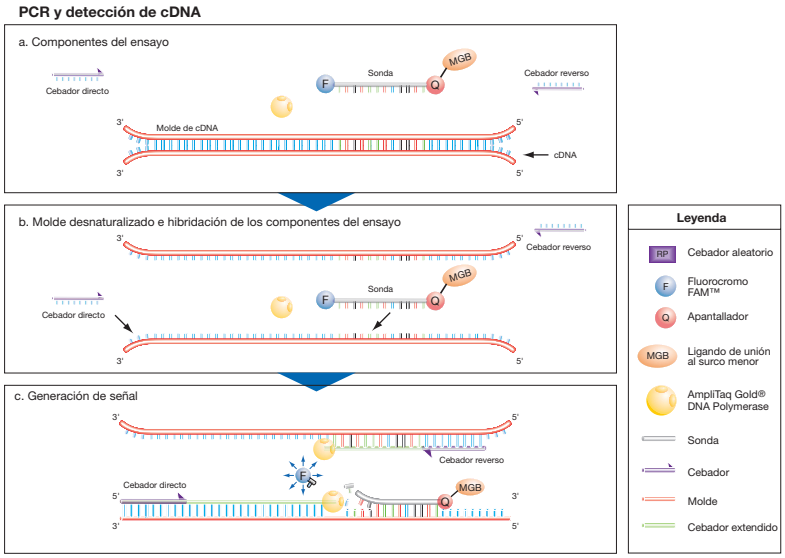
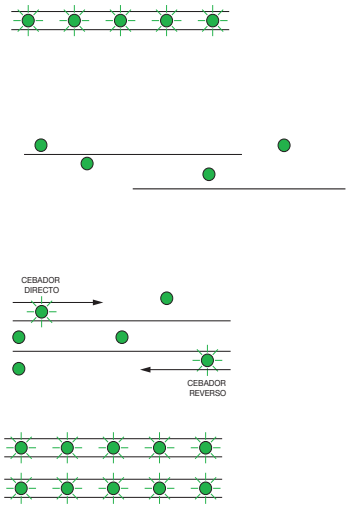
Nota: Para obtener más información acerca de AmpErase® UNG, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Notas

Reactivos

Reactivos TaqMan® y SYBR® Green

Applied Biosystems ofrece reactivos TaqMan® y SYBR® Green para utilizarlos en el sistema StepOne. Ambos tipos de reactivos se describen brevemente en la siguiente tabla.

Tipo de reactivo	Proceso
Reactivos o kits TaqMan® **Descripción** Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica para permitir la detección de un producto de PCR específico cuando se acumula durante los ciclos de PCR. **Ventajas** • Aumenta la especificidad con una sonda. La hibridación específica entre la sonda y el gen diana genera una señal de fluorescencia. • Permite el trabajo en multiplex. • Hay disponibles ensayos optimizados. • Permite realizar ensayos de 5′ nucleasas durante la PCR. • Se puede utilizar para la RT-PCR de 1 o 2 pasos.	
Reactivos SYBR® Green **Descripción** Los reactivos SYBR Green utilizan el fluorocromo SYBR® Green I, que se une a DNA de doble cadena y permite detectar productos de PCR cuando se acumulan durante los ciclos de la reacción. **Ventajas** • Económico (no se necesita una sonda). • Permite que los análisis de curvas de fusión midan la Tm de todos los productos de PCR. • Se puede utilizar para la RT-PCR de 1 o 2 pasos. **Limitaciones** Se une de manera no específica a todas las secuencias de DNA de doble cadena. Para evitar señales positivas falsas, compruebe la formación de un producto no específico utilizando un gel de agarosa o las curvas de fusión.	 **Paso 1: Configuración de la reacción** El fluorocromo SYBR® Green I emite una fluorescencia cuando se une a DNA de doble cadena. **Paso 2: Desnaturalización** Cuando el DNA se desnaturaliza, se libera el fluorocromo SYBR® Green I y la fluorescencia disminuye considerablemente. **Paso 3: Polimerización** Durante la extensión, los cebadores se hibridan y se genera el producto de PCR. **Paso 4: Polimerización completada** El fluorocromo SYBR® Green I se une al producto bicatenario, lo que produce un aumento neto de la fluorescencia que detecta el instrumento.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso de fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador en el sistema StepOne™.

Notas

Otros reactivos

Se pueden utilizar otros reactivos basados en fluorescencia en el sistema StepOne, pero se debe tener en cuenta lo siguiente:

- El software StepOne calcula automáticamente los volúmenes de reacción de los reactivos TaqMan y SYBR Green, pero no lo hace con otros reactivos.
- Se debe diseñar el experimento con el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada), en lugar de con el asistente de diseño. (Consulte "Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)" en la página 206.)

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de los experimentos de PCR a tiempo real, las opciones de PCR y los reactivos, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Cómo utilizar esta guía

Esta guía sirve a la vez de tutorial y de guía para realizar sus propios experimentos.

Uso de esta guía como tutorial

Si emplea los datos de los experimentos de ejemplo que se incluyen con el software StepOne, esta guía le puede servir de tutorial para realizar un experimento de curva estándar relativa o C_T comparativos en el sistema StepOne. Siga los procedimientos que se indican en los capítulos correspondientes:

Capítulo		Procedimiento
Curva estándar relativa	**C_T comparativos**	
2	6	Diseñe el experimento con el asistente de diseño del software StepOne.
3	7	Prepare el experimento con los reactivos y los volúmenes que ha calculado el asistente de diseño en el capítulo 2 (experimento de curva estándar relativa) o en el capítulo 6 (experimento de C_T comparativos).
4	8	Realice el experimento en el instrumento StepOne (disposición autónoma o conectada).
5	9	Analice los resultados.

Para obtener más información, consulte "Acerca del experimento de ejemplo" en la página 10.

Uso de esta guía con sus propios experimentos

Después de realizar los ejercicios del tutorial de los capítulos 2 a 9, esta guía le puede servir para guiarle por el flujo de trabajo del asistente de diseño para realizar sus propios experimentos de curva estándar relativa o C_T comparativos. Cada uno de los procedimientos de los capítulos 2 - 9 contiene un conjunto de directrices que ofrecen información acerca de cómo realizar sus propios experimentos.

Notas

Asimismo, puede utilizar cualquiera de los otros flujos de trabajo que se incluyen en el software StepOne para realizar sus experimentos. En la siguiente tabla, se ofrece un resumen de todos los flujos de trabajo disponibles en el software StepOne.

Flujo de trabajo	Descripción	Véase...
Design Wizard (Asistente de diseño)	Escriba los parámetros del experimento mientras el asistente le guía por los procedimientos óptimos.	Capítulo 2 o Capítulo 6
Advanced Setup (Configuración avanzada)	Configure un experimento nuevo basándose en su propio criterio. Da flexibilidad de diseño a los usuarios experimentados.	página 206
QuickStart (Inicio rápido)	Realice un experimento nuevo sin introducir información de la configuración de la placa.	página 207
Molde	Configure un experimento nuevo utilizando la información de configuración de un molde anterior.	página 208
Exportación/ importación	Importe diseños de experimentos desde archivos de texto ASCII que contienen información de configuración de los experimentos.	página 209

Acerca del experimento de ejemplo

Para ilustrar cómo se realizan los experimentos de curva estándar relativa y C_T comparativos, esta guía le conduce a través del proceso de diseño, preparación, procesamiento y análisis de un experimento de ejemplo. El experimento de ejemplo representa una configuración típica que puede utilizar para familiarizarse rápidamente con el sistema StepOne.

Descripción del experimento de curva estándar relativa de ejemplo

El objetivo del experimento de curva estándar relativa de ejemplo es comparar la expresión del factor de transcripción c-myc (una oncoproteína que activa la transcripción de los genes asociados al crecimiento) en los tejidos de hígado y riñón.

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

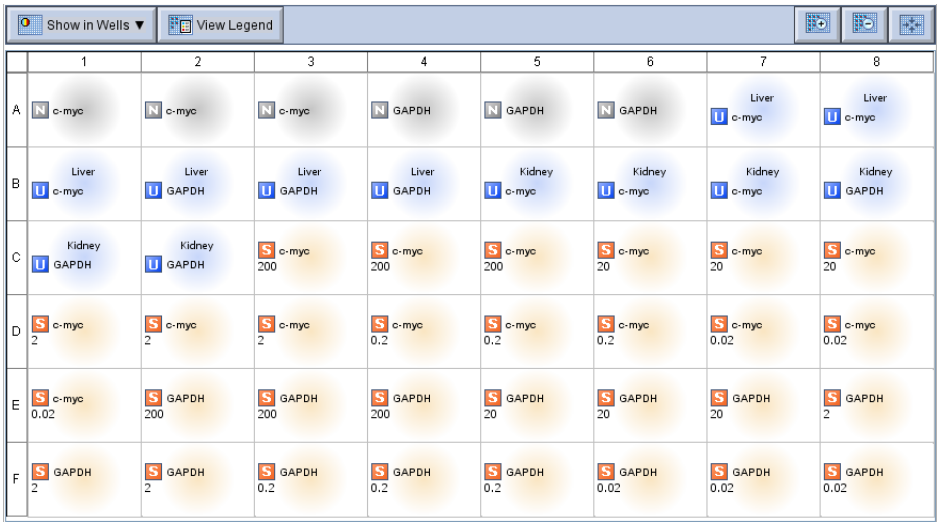
- Las muestras son cDNA preparados a partir de RNA total aislado de hígado y riñón.
- El gen diana es el gen c-myc humano.
- El control endógeno es la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humano.
- La muestra de referencia es RNA aislado de riñón.
- Se configura una curva estándar para el gen c-myc (diana). El estándar que se utiliza para la dilución seriada es una muestra de cDNA de una muestra de concentración conocida preparada a partir de RNA aislado de pulmón.
- Se configura una curva estándar para el GAPDH (control endógeno). El estándar que se utiliza para la dilución seriada es una muestra de cDNA de una muestra de concentración conocida preparada a partir de RNA aislado de pulmón.

Notas

- El experimento está diseñado para una PCR en singleplex, donde los ensayos de gen diana (c-myc) y control endógeno (GAPDH) se amplifican en diferentes pocillos.
- Las reacciones están preparadas para una RT-PCR de 2 pasos. Se utiliza High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit para la retrotranscripción y TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix para la PCR.
- Se seleccionan ensayos de la línea de productos Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays:
  - Para el ensayo diana (c-myc), el identificador del ensayo es Hs00153408_m1 (RefSeq NM_002467.3).
  - Para el ensayo de control endógeno (GAPDH), el identificador del ensayo es Hs99999905_m1 (RefSeq NM_002046.2).

Disposición de la placa de reacción

A continuación, se muestra la disposición de la placa de reacción del experimento de curva estándar relativa de ejemplo.


Show in Wells
View Legend
1 2 3 4 5 6 7 8
A: N c-myc | N c-myc | N c-myc | N GAPDH | N GAPDH | N GAPDH | Liver U c-myc | Liver U c-myc
B: Liver U c-myc | Liver U GAPDH | Liver U GAPDH | Liver U GAPDH | Kidney U c-myc | Kidney U c-myc | Kidney U c-myc | Kidney U GAPDH
C: Kidney U GAPDH | Kidney U GAPDH | S c-myc 200 | S c-myc 200 | S c-myc 200 | S c-myc 20 | S c-myc 20 | S c-myc 20
D: S c-myc 2 | S c-myc 2 | S c-myc 2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.02 | S c-myc 0.02
E: S c-myc 0.02 | S GAPDH 200 | S GAPDH 200 | S GAPDH 200 | S GAPDH 20 | S GAPDH 20 | S GAPDH 20 | S GAPDH 2
F: S GAPDH 2 | S GAPDH 2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.02 | S GAPDH 0.02 | S GAPDH 0.02

Descripción del experimento de C_T comparativos de ejemplo

El objetivo del experimento de C_T comparativos de ejemplo es comparar la expresión de TP53 (un factor de transcripción que regula otros genes) en tejidos de hígado, riñón y cerebro.

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

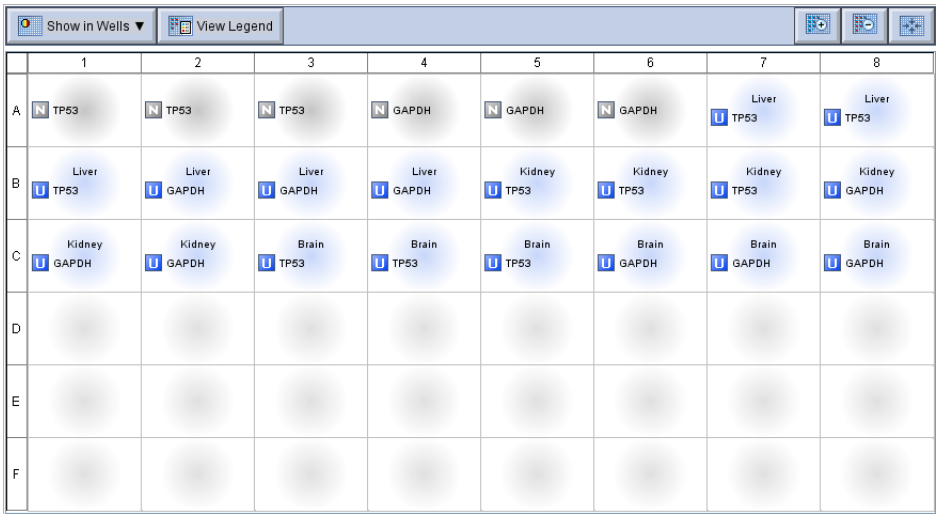
- Las muestras son cDNA preparados a partir de RNA total aislado de hígado, riñón y cerebro.
- El gen diana es TP53.
- La muestra de referencia es del cerebro.
- El control endógeno es GAPDH humano.
- El experimento está diseñado para una PCR en singleplex, donde los ensayos de gen diana (c-myc) y control endógeno (GAPDH) se amplifican en diferentes pocillos.

Notas

- Las reacciones están preparadas para una RT-PCR de 2 pasos. Se utiliza High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit para la retrotranscripción y TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix para la PCR.
- Se seleccionan ensayos de la línea de productos Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays:
  - Para el ensayo diana (TP53), el identificador del ensayo es Hs00153340_m1 (RefSeq NM_000546.2).
  - Para el ensayo de control endógeno (GAPDH), se utiliza el kit de control endógeno GAPD (GAPDH) humano (PN 4333764T).

Disposición de la placa de reacción

A continuación, se muestra la disposición de la placa de reacción del experimento de C_T comparativos de ejemplo.


Show in Wells
View Legend
1 2 3 4 5 6 7 8
A N TP53 | N TP53 | N TP53 | N GAPDH | N GAPDH | N GAPDH | Liver U TP53 | Liver U TP53
B Liver U TP53 | Liver U GAPDH | Liver U GAPDH | Liver U GAPDH | Kidney U TP53 | Kidney U TP53 | Kidney U TP53 | Kidney U GAPDH
C Kidney U GAPDH | Kidney U GAPDH | Brain U TP53 | Brain U TP53 | Brain U TP53 | Brain U GAPDH | Brain U GAPDH | Brain U GAPDH
D
E
F

Acerca de los datos del experimento de ejemplo

Los archivos de datos de los experimentos de ejemplo se instalan con el software StepOne. Encontrará los archivos de los experimentos de ejemplo en su ordenador:

<*unidad*>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

donde <*unidad*> es la unidad del disco duro del ordenador en la que está instalado el software StepOne. La unidad de instalación predeterminada del software es la unidad C.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

La figura de la página 13 muestra el flujo de trabajo de los experimentos de curva estándar relativa y C_T comparativos.

Notas

Experimento de curva estándar relativa
Inicio del experimento

Diseño del experimento (Capítulo 2)

1. Cree un nuevo experimento.
2. Defina las propiedades del experimento.
3. Defina los métodos y los materiales.
4. Configure los genes diana.
5. Configure los estándares.
6. Configure las muestras.
7. Configure la cuantificación relativa.
8. Configure el protocolo de termociclado.
9. Revise la configuración de la reacción.
10. Solicite materiales para el experimento.
11. Finalice el flujo de trabajo del asistente de diseño.

Preparación de las reacciones (Capítulo 3)

1. Prepare el molde.
2. Prepare las diluciones de las muestras.
3. Prepare la dilución seriada.
4. Prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana.
5. Prepare la placa de reacción.

Realización del experimento (Capítulo 4)

1. Prepare la reacción.
2. Active las opciones de notificación.
3. Inicie la reacción.
4. Monitorice la reacción.
5. Descargue el instrumento y transfiera los datos.

Análisis del experimento (Capítulo 5)

Sección 1. Revisión de los resultados:

1. Analice.
2. Revise la pantalla Standard Curve (Curva estándar).
3. Revise la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación).
4. Revise la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) o la tabla de pocillos.
5. Presente los datos.

Sección 2. Solución de problemas:

1. Revise las opciones de análisis; ajuste la línea basal y el umbral.
2. Revise la pantalla QC Summary (Resumen QC).
3. Omita pocillos.
4. Revise la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente).
5. Revise la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos).

Fin del experimento

Experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$)
Inicio del experimento

Diseño del experimento (Capítulo 6)

1. Cree un nuevo experimento.
2. Defina las propiedades del experimento.
3. Defina los métodos y los materiales.
4. Configure los genes diana.
5. Configure las muestras.
6. Configure la cuantificación relativa.
7. Configure el protocolo de termociclado.
8. Revise la configuración de la reacción.
9. Solicite materiales para el experimento.
10. Finalice el flujo de trabajo del asistente de diseño.

Preparación de las reacciones (Capítulo 7)

1. Prepare el molde.
2. Prepare las diluciones de las muestras.
3. Prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana.
4. Prepare la placa de reacción.

Realización del experimento (Capítulo 8)

1. Prepare la reacción.
2. Active las opciones de notificación.
3. Inicie la reacción.
4. Monitorice la reacción.
5. Descargue el instrumento y transfiera los datos.

Análisis del experimento (Capítulo 9)

Sección 1. Revisión de los resultados:

1. Analice.
2. Revise la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) o la tabla de pocillos.
3. Revise la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación).
4. Presente los datos.

Sección 2. Solución de problemas:

1. Revise las opciones de análisis; ajuste la línea basal y el umbral.
2. Revise la pantalla QC Summary (Resumen QC).
3. Omita pocillos.
4. Revise la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente).
5. Revise la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos).

Fin del experimento

Notas

Notas

2 Diseño del experimento de curva estándar relativa

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Resumen del capítulo 16
- Creación de un nuevo experimento. 17
- Definición de las propiedades del experimento 20
- Definición de los métodos y materiales 22
- Configuración de los genes diana. 25
- Configuración de los estándares. 28
- Configuración de las muestras 30
- Configuración de las opciones de cuantificación relativa 32
- Configuración del protocolo de termociclado 33
- Revisión de la configuración de la reacción. 35
- Solicitud de materiales para el experimento. 43
- Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño. 46

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

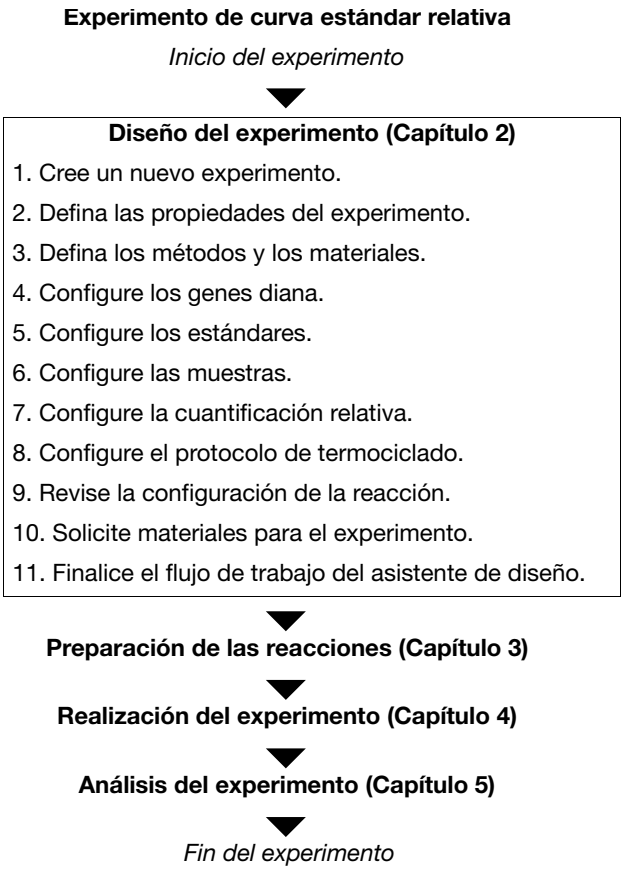
Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo utilizar el asistente de diseño en el software StepOne™ para configurar el experimento de curva estándar relativa de ejemplo. El asistente de diseño le guiará por los procedimientos óptimos recomendados por Applied Biosystems a medida que vaya introduciendo los parámetros de diseño del experimento de ejemplo.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para diseñar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.

Nota: Diseñe el experimento de ejemplo con el flujo de trabajo del asistente de diseño del software StepOne. Cuando diseñe sus propios experimentos, puede seleccionar flujos de trabajo alternativos (consulte "Uso de esta guía con sus propios experimentos" en la página 9).


Experimento de curva estándar relativa
Inicio del experimento
Diseño del experimento (Capítulo 2)
1. Cree un nuevo experimento.
2. Defina las propiedades del experimento.
3. Defina los métodos y los materiales.
4. Configure los genes diana.
5. Configure los estándares.
6. Configure las muestras.
7. Configure la cuantificación relativa.
8. Configure el protocolo de termociclado.
9. Revise la configuración de la reacción.
10. Solicite materiales para el experimento.
11. Finalice el flujo de trabajo del asistente de diseño.
Preparación de las reacciones (Capítulo 3)
Realización del experimento (Capítulo 4)
Análisis del experimento (Capítulo 5)
Fin del experimento

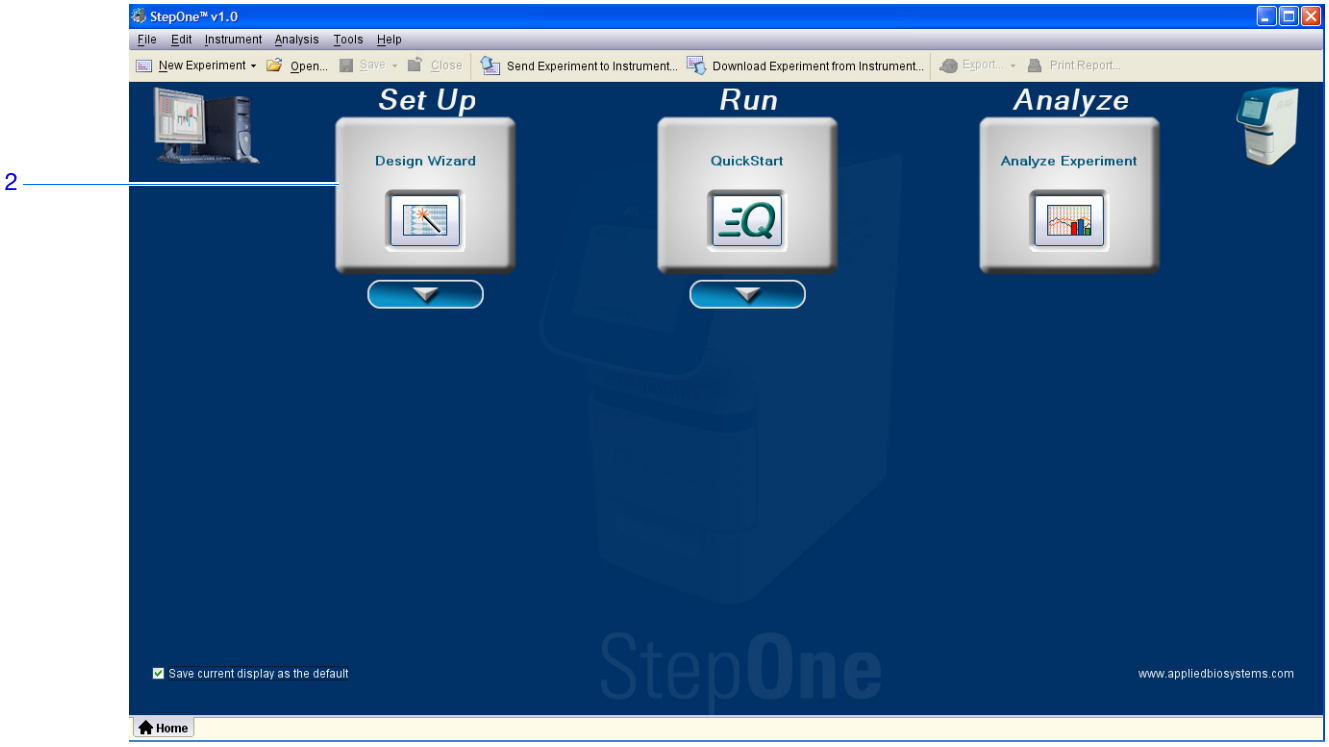
Notas

Creación de un nuevo experimento

Cree un experimento nuevo con el asistente de diseño del software StepOne.

Creación de un experimento

1. Haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Design Wizard** (Asistente de diseño) para abrir el asistente de diseño.



3. Consulte "Elementos del software" más adelante para obtener información acerca de la navegación por el asistente de diseño.

Elementos del software

A continuación, se ilustran los elementos del software StepOne para el asistente de diseño.

1. Barra de menús: muestra los menús disponibles en el software:
   - File (Archivo)
   - Edit (Edición)
   - Instrument (Instrumento)
   - Analysis (Análisis)
   - Tools (Herramientas)
   - Help (Ayuda)

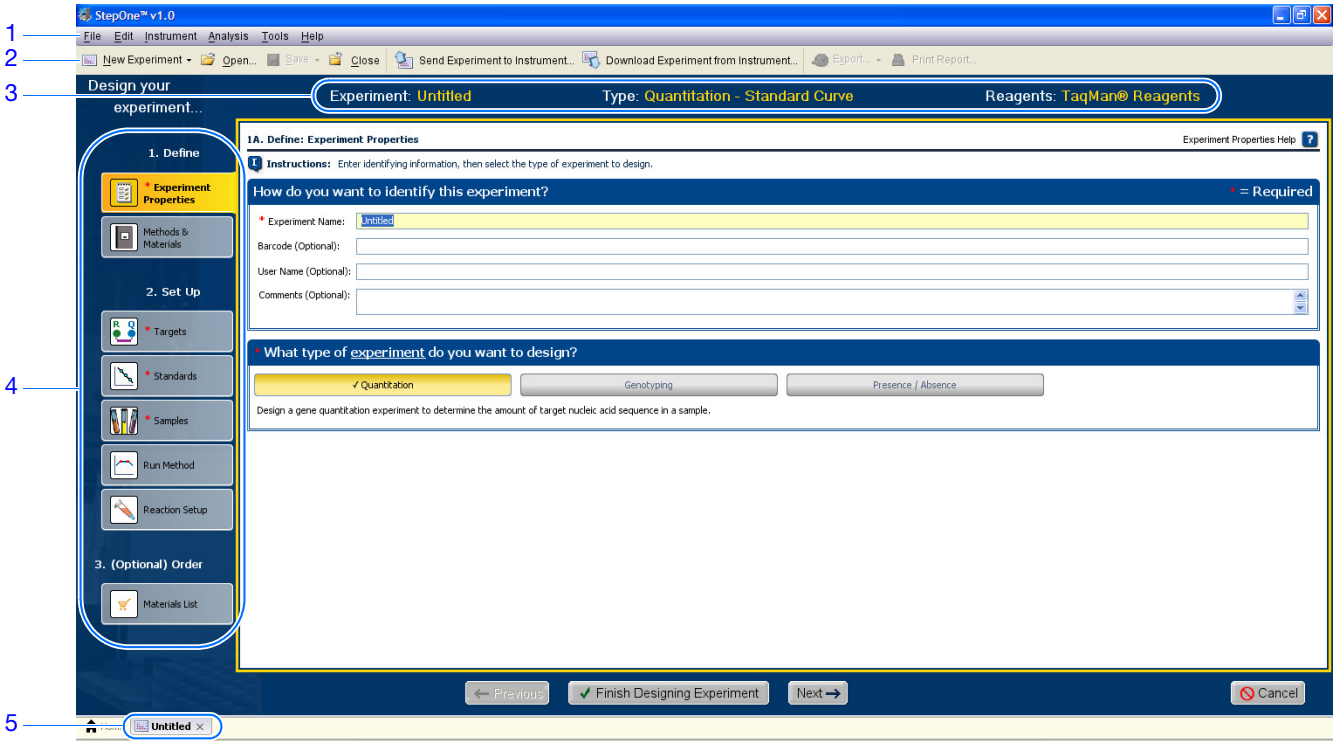
Notas

2. Barra de herramientas: muestra las herramientas disponibles en el software:
   - New Experiment (Experimento nuevo)
   - Open (Abrir)
   - Close (Cerrar)
   - Send Experiment to Instrument (Enviar experimento al instrumento)
   - Download Experiment from Instrument (Descargar experimento del instrumento)
3. Cabecera del experimento: indica el nombre del experimento, el tipo de experimento y los reactivos del experimento abierto.
4. Panel de navegación: ofrece enlaces a todas las pantallas del asistente de diseño:
   - Experiment Properties (Propiedades del experimento)
   - Methods & Materials (Métodos y materiales)
   - Targets (Dianas)
   - Opciones de cuantificación relativa
   - Standards (Estándares)
   - Samples (Muestras)
   - Run Method (Protocolo de termociclado)
   - Reaction Setup (Configuración de la reacción)
   - Materials List (Lista de materiales)

Nota: Inicialmente, el asistente de diseño muestra el tipo de experimento Quantitation - Standard Curve (Cuantificación: curva estándar). Las pantallas disponibles de este asistente pueden cambiar si se selecciona otro tipo de experimento. Por ejemplo, la pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa) no aparece hasta que se selecciona el tipo de experimento de curva estándar o C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$).

Notas

5. Fichas del experimento: muestra una ficha por cada experimento abierto.



Notas

Definición de las propiedades del experimento

En la pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento), escriba la información de identificación del experimento y, a continuación, seleccione el tipo de experimento que desea diseñar.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- El experimento se identifica como un ejemplo.
- Se utiliza una MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate.
- El tipo de experimento es de cuantificación.

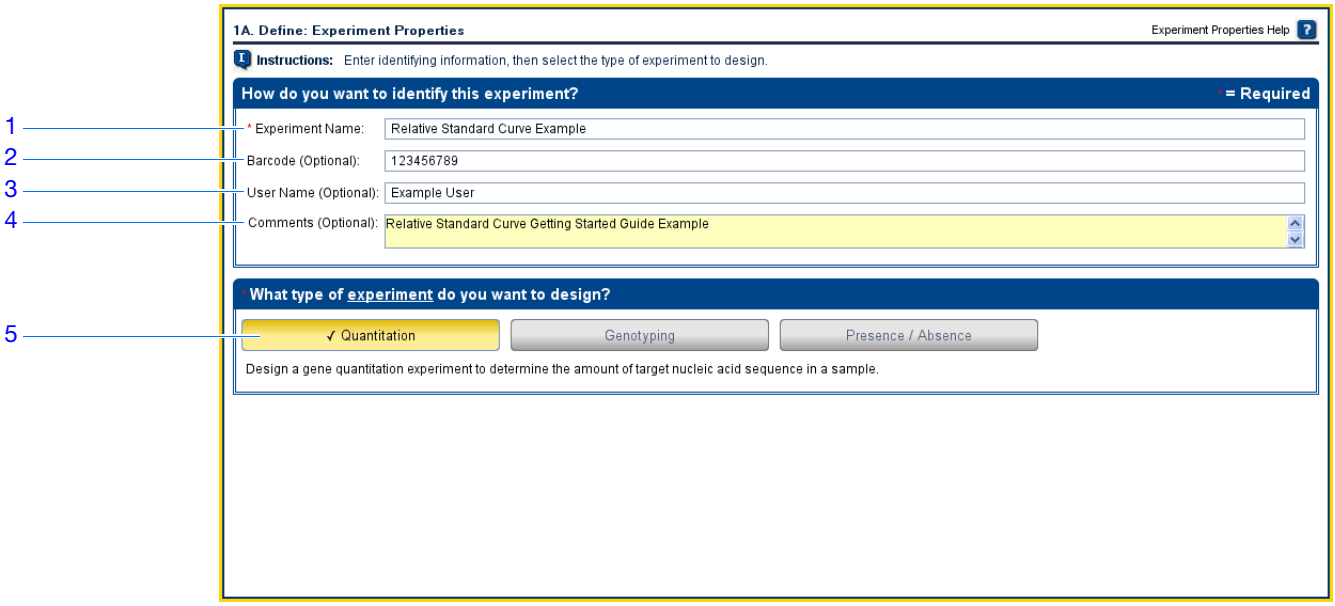
Pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento)

1. Haga clic en el campo **Experiment Name** (Nombre de experimento) y, a continuación, escriba **Relative Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar relativa).

   Nota: La cabecera del experimento se actualiza con el nombre del experimento que acaba de escribir.

2. Haga clic en el campo ***Barcode (Código de barras)*** y, a continuación, escriba el código de barras que aparece en la placa de reacción de PCR, si es que dispone de uno.
3. Haga clic en el campo **User Name** (Nombre de usuario) y, a continuación, escriba **Example User** (Usuario de ejemplo).
4. Haga clic en el campo **Comments** (Comentarios) y, a continuación, escriba **Relative Standard Curve Getting Started Guide Example** (Ejemplo de la guía de introducción de las curvas estándar relativas).
5. Seleccione **Quantitation** (Cuantificación) en el tipo de experimento.
6. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas


1A. Define: Experiment Properties
Experiment Properties Help
Instructions: Enter identifying information, then select the type of experiment to design.
How do you want to identify this experiment?
* = Required
1
* Experiment Name:
Relative Standard Curve Example
2
Barcode (Optional):
123456789
3
User Name (Optional):
Example User
4
Comments (Optional):
Relative Standard Curve Getting Started Guide Example
* What type of experiment do you want to design?
5
✓ Quantitation
Genotyping
Presence / Absence
Design a gene quantitation experiment to determine the amount of target nucleic acid sequence in a sample.

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- Escriba un nombre para el experimento que sea descriptivo y fácil de recordar. El nombre del experimento se utiliza como nombre de archivo predeterminado del experimento. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Experiment Name (Nombre de experimento).

  Nota: No se pueden utilizar los siguientes caracteres en en campo Experiment Name (Nombre de experimento): barra inclinada hacia delante (/), barra inclinada hacia atrás (\), signo mayor que (>), signo menor que (<), asterisco (*), signo de interrogación (?), comillas ("), línea vertical (|), dos puntos (:) o punto y coma (;).

- Utilice MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates, MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips o MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps. Los consumibles tipo rápido se pueden utilizar tanto con reactivos de modo rápido como de modo estándar.
- *(Opcional)* Introduzca el código de barras de la placa de reacción de PCR, si es que lo tiene. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Barcode (Código de barras).
- *(Opcional)* Escriba un nombre de usuario para identificar al propietario del experimento. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo User Name (Nombre de usuario).
- *(Opcional)* Escriba comentarios para describir el experimento. Puede introducir hasta 1000 caracteres en el campo Comments (Comentarios).
- Seleccione **Quantitation** (Cuantificación) en el tipo de experimento.

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- Consumibles, consulte "Consumibles admitidos" en la página 3.
- Experimentos de cuantificación, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Definición de los métodos y materiales

En la pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales), seleccione el método de cuantificación, los reactivos, la velocidad de rampa y el tipo de molde que se van a utilizar en el experimento.

Acerca del experimento de ejemplo

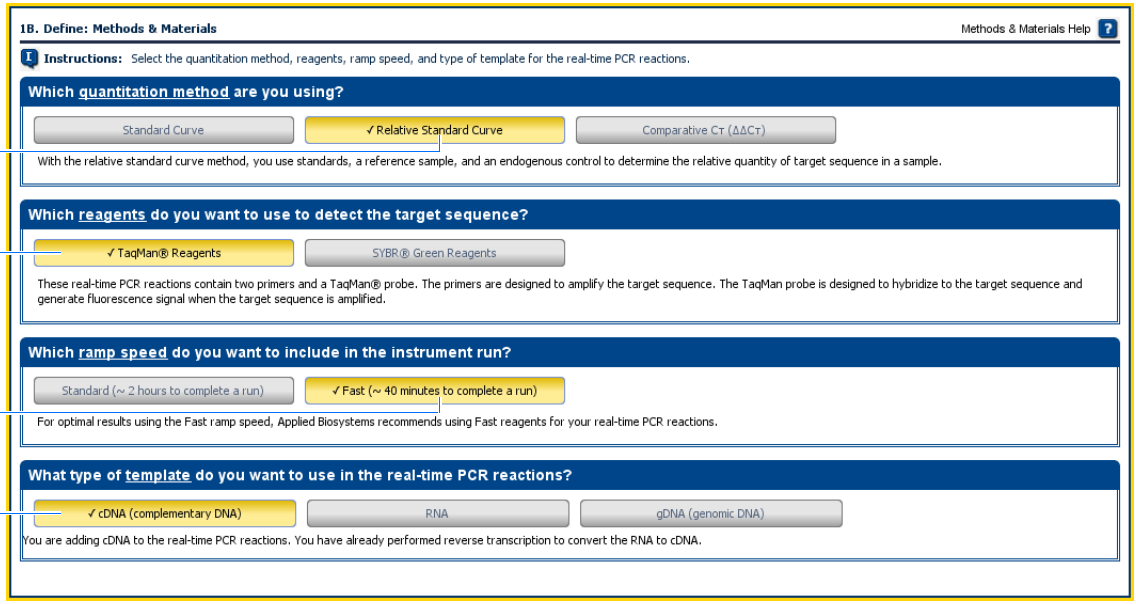
En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Se utiliza el método de cuantificación de curva estándar relativa.
- Se utilizan reactivos TaqMan®.
- Se utiliza la velocidad de rampa rápida en el protocolo de termociclado.
- cDNA (preparado a partir de RNA total aislado de hígado y riñón) es el tipo de molde. Para obtener el molde de cDNA, primero hay que realizar una retrotranscripción de RNA para convertir el RNA en cDNA (consulte "Preparación del molde" en la página 51).

Pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales)

1. Seleccione **Relative Standard Curve** (Curva estándar relativa) como método de cuantificación.
2. Seleccione **ensayos TaqMan®** para los reactivos.
3. Seleccione **Fast (~40 minutes to complete a run)** (Rápido (40 minutos aproximadamente para completar una reacción)) para la velocidad de la rampa.
4. Seleccione **cDNA (complementary DNA)** (cDNA (DNA complementario)) para el tipo de molde.
5. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas


1B. Define: Methods & Materials
Methods & Materials Help
Instructions: Select the quantitation method, reagents, ramp speed, and type of template for the real-time PCR reactions.
Which quantitation method are you using?
Standard Curve
✓ Relative Standard Curve
Comparative CT (ΔΔCT)
With the relative standard curve method, you use standards, a reference sample, and an endogenous control to determine the relative quantity of target sequence in a sample.
Which reagents do you want to use to detect the target sequence?
✓ TaqMan® Reagents
SYBR® Green Reagents
These real-time PCR reactions contain two primers and a TaqMan® probe. The primers are designed to amplify the target sequence. The TaqMan probe is designed to hybridize to the target sequence and generate fluorescence signal when the target sequence is amplified.
Which ramp speed do you want to include in the instrument run?
Standard (~ 2 hours to complete a run)
✓ Fast (~ 40 minutes to complete a run)
For optimal results using the Fast ramp speed, Applied Biosystems recommends using Fast reagents for your real-time PCR reactions.
What type of template do you want to use in the real-time PCR reactions?
✓ cDNA (complementary DNA)
RNA
gDNA (genomic DNA)
You are adding cDNA to the real-time PCR reactions. You have already performed reverse transcription to convert the RNA to cDNA.
1
2
3
4

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- Seleccione **Relative Standard Curve** (Curva estándar relativa) como método de cuantificación. Los experimentos de curva estándar relativa determinan el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen diana de una muestra de referencia. Para conseguir los resultados, se utiliza una curva estándar construida a partir de una dilución seriada de cantidad conocida. Para configurar la placa de reacción, el método de curva estándar relativa requiere dianas, estándares, muestras, una muestra de referencia y un control endógeno.
- Seleccione los reactivos que desea utilizar:
  - Seleccione **Reagents TaqMan®** (ensayos TaqMan®) si desea utilizar estos reactivos para detectar la amplificación y cuantificar la cantidad de gen diana en las muestras. Los reactivos TaqMan se componen de dos cebadores y una sonda TaqMan®. Los cebadores están diseñados para amplificar el gen diana. La sonda TaqMan está diseñada para hibridar en el gen diana y generar una señal de fluorescencia cuando se amplifica el gen diana.

    ¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador en el sistema StepOne™.

  - Seleccione **SYBR® Green Reagents** (reactivos SYBR® Green) si desea utilizar estos reactivos para detectar la amplificación y cuantificar la cantidad de gen diana en las muestras. Los reactivos SYBR Green se componen de dos cebadores y un fluorocromo SYBR Green. Los cebadores están diseñados para amplificar el

Notas

gen diana. El fluorocromo SYBR Green genera señal de fluorescencia cuando se une a DNA de doble cadena. El fluorocromo SYBR Green suele formar parte de la mezcla maestra SYBR Green que se añade a la reacción. Si utiliza el fluorocromo SYBR Green:

Active la casilla de verificación **Include Melt Curve** (Incluir curva de disociación) para realizar un análisis de curva de disociación del gen diana amplificado.

Seleccione **Standard** (Estándar) para la velocidad de la rampa. Applied Biosystems no dispone de una mezcla maestra que funcione en modo rápido para reactivos SYBR Green.

Nota: Se pueden utilizar otros reactivos basados en fluorescencia en el sistema StepOne; sin embargo, debe diseñar su experimento con el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) en lugar de con el asistente de diseño. Consulte "Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)" en la página 206.

- Seleccione la velocidad de rampa apropiada para el protocolo de termociclado:
  - Seleccione **Fast (~40 Minutes to Complete a Run)** (Rápido (aproximadamente 40 minutos para completar una reacción)) si utiliza reactivos tipo rápido para las reacciones de PCR.
  - Seleccione **Standard (~2 Hours to Complete a Run)** (Estándar (aproximadamente 2 horas para completar una reacción)) si utiliza reactivos estándar para las reacciones de PCR (incluidos reactivos SYBR Green y reactivos TaqMan estándar).
- Seleccione el molde para la PCR apropiado:
  - Seleccione **cDNA (complementary DNA)** (cDNA (DNA complementario)) si va a realizar una RT-PCR de 2 pasos y ya ha realizado la retrotranscripción para convertir el RNA en cDNA. Se añade DNA complementario a las reacciones de PCR.
  - Seleccione **RNA** si va a realizar una RT-PCR de 1 paso. Se añade el RNA o mRNA total a las reacciones de PCR.
  - Seleccione **gDNA (genomic DNA)** (gDNA (DNA genómico)) si ya ha extraído el gDNA de un tejido o una muestra. Se añade DNA genómico purificado a las reacciones de PCR.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- El uso del método de cuantificación de C_T comparativos, consulte los capítulos 6 -9 de esta guía.
- El uso del método de cuantificación de curva estándar, consulte la *Guía de introducción a StepOne™ Real-Time PCR System para experimentos de curva estándar.*
- Los reactivos TaqMan y SYBR Green, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Notas

- La PCR, incluida la PCR en singleplex y en multiplex, y la RT - PCR de 1 y de 2 pasos, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Configuración de los genes diana

En la pantalla Targets (Dianas), escriba el número de genes diana que desea cuantificar en la placa de reacción de PCR y, a continuación, configure el ensayo para cada gen diana.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Se cuantifican dos dianas en la placa de reacción.
- Se activa la casilla de verificación Set Up Standards (Configurar estándares). Cuando se activa esta casilla de verificación, el software muestra automáticamente la pantalla Standards (Estándares) después de completar la pantalla Targets (Dianas). En la pantalla Standards (Estándares), se puede configurar una curva estándar para cada ensayo diana (consulte "Configuración de los estándares" en la página 28).
- El ensayo Target 1 (Diana 1) está configurado para el gen diana que se está estudiando. En el experimento de ejemplo, se trata del gen c-myc humano (una oncoproteína que activa la transcripción de los genes asociados al crecimiento).
- El ensayo Target 2 (Diana 2) se configura para el control endógeno. Para el experimento de ejemplo, se trata de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humano. El GAPDH se utiliza como control endógeno, porque sus niveles de expresión suelen ser relativamente estables.

Pantalla Targets (Dianas)

1. Haga clic en el campo **How many targets do you want to quantify in the reaction plate?** (¿Cuántas dianas desea cuantificar en la placa de reacción?) y, a continuación, escriba 2.

   Nota: El número de filas de la tabla de ensayos diana se actualiza con el número que escriba.

2. Active la casilla de verificación **Set Up Standards** (Configurar estándares) para configurar estándares para ambos ensayos diana.

   Nota: La casilla de verificación Set Up Standards (Configurar estándares) está activada de manera predeterminada.

3. Configure el ensayo Target 1 (Diana 1):

   a. Haga clic en la celda **Enter Target Name** (Escriba nombre de gen diana) y, a continuación, escriba **c-myc**.

   b. En el menú desplegable Reporter (Notificador), seleccione **FAM** (predeterminado).

Notas

c. En el menú desplegable Quencher (Apantallador), seleccione **NFQ-MGB** (predeterminado).

d. Deje la opción predeterminada en el campo Color.

4. Configure el ensayo Target 2 (Diana 2):

a. Haga clic en la celda **Enter Target Name** (Escriba nombre de gen diana) y, a continuación, escriba **GAPDH**.

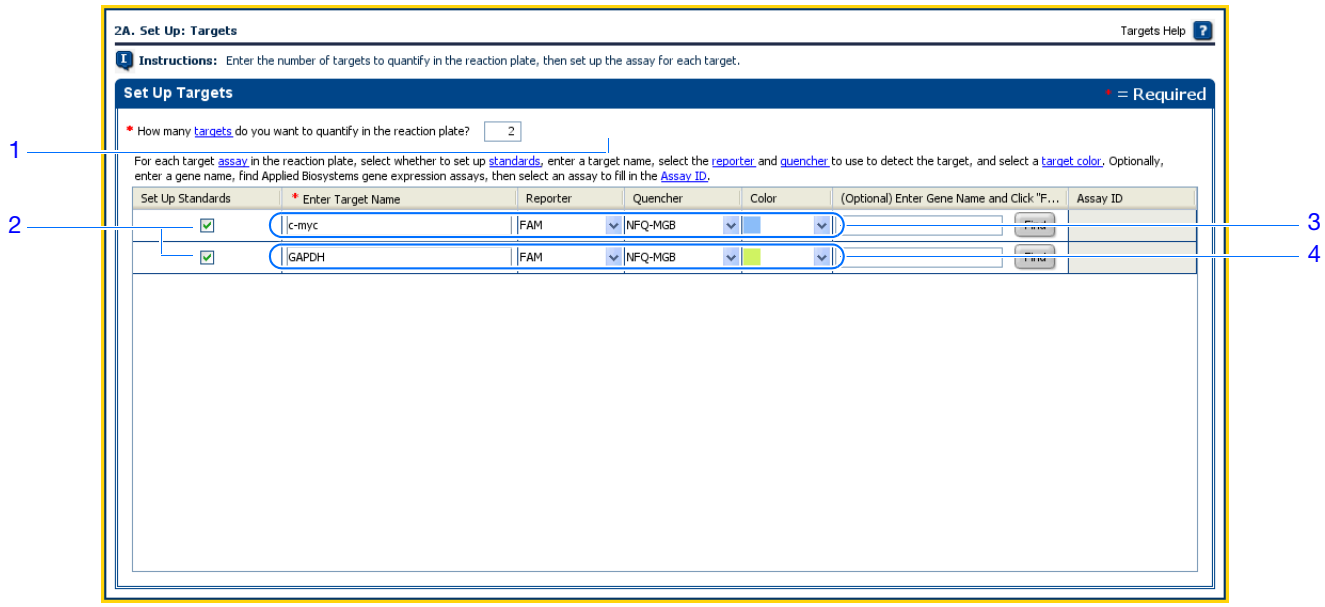
b. En el menú desplegable Reporter (Notificador), seleccione **FAM** (predeterminado).

c. En el menú desplegable Quencher (Apantallador), seleccione **NFQ-MGB** (predeterminado).

d. Deje la opción predeterminada en el campo Color.

5. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Nota: En todos los genes diana, deje en blanco el campo (Optional) Enter Gene Name ((Opcional) Escriba el nombre del gen). Puede buscar el identificador del gen/ensayo para solicitar los materiales (consulte "Solicitud de materiales para el experimento" en la página 43).


2A. Set Up: Targets
Targets Help
Instructions: Enter the number of targets to quantify in the reaction plate, then set up the assay for each target.
Set Up Targets
* = Required
* How many targets do you want to quantify in the reaction plate? 2
For each target assay in the reaction plate, select whether to set up standards, enter a target name, select the reporter and quencher to use to detect the target, and select a target color. Optionally, enter a gene name, find Applied Biosystems gene expression assays, then select an assay to fill in the Assay ID.
Set Up Standards
* Enter Target Name
Reporter
Quencher
Color
(Optional) Enter Gene Name and Click "F...
Assay ID
c-myc
FAM
NFQ-MGB
GAPDH
FAM
NFQ-MGB
1
2
3
4

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Active la casilla de verificación **Set Up Standards** (Configurar estándares). Applied Biosystems recomienda configurar una curva estándar para cada ensayo diana en la placa de reacción.
- Identifique cada ensayo diana con un nombre y un color únicos. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Target Name (Nombre de gen diana).

Notas

- Seleccione un control endógeno para cada muestra. El control endógeno es un gen diana que está presente en todas las muestras que se están investigando. Se debería expresar por igual en todos los tipos de muestras, con independencia del tratamiento o el origen del tejido (ejemplos de controles endógenos: β-actina, GAPDH y RNA ribosomal 18S [rRNA 18S]). El control endógeno se utiliza para normalizar los resultados de la PCR, ya que corrige las variaciones en la cantidad de molde, la eficiencia de extracción del ácido nucleico, la eficiencia de la retrotranscripción y los errores de calibración de las pipetas. Tenga en cuenta que:
  - Cada tipo de muestra (por ejemplo, cada tejido de un estudio en el que se comparan múltiples tejidos) requiere un control endógeno.
  - Si las muestras están distribuidas en múltiples placas, cada placa debe tener un control endógeno. Asimismo, cada placa debe incluir un control endógeno para cada tipo de muestra de la placa.
- Seleccione el fluorocromo del notificador utilizado en el ensayo diana:
  - Seleccione **FAM** si el fluorocromo FAM™ está unido al extremo de 5′ de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.
  - Seleccione **JOE** si el fluorocromo JOE™ está unido al extremo de 5′ de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.
  - Seleccione **VIC** si el fluorocromo VIC® está unido al extremo de 5′ de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.
  - Seleccione **SYBR** si utiliza fluorocromo SYBR® Green para detectar DNA de doble cadena.
- Seleccione el apantallador utilizado en el ensayo diana:
  - Seleccione **NFQ-MGB** si en el extremo 3′ de a sonda TaqMan que está utilizando para detectar el gen diana hay unido un apantallador no fluorescente de unión al surco menor de la doble cadena de DNA.
  - Seleccione **None** (Ninguno) si se utiliza el fluorocromo SYBR Green.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso de fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador en el sistema StepOne™.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Targets (Dianas), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- La selección de un control endógeno, consulte la nota de aplicación *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies*.

Notas

Configuración de los estándares

En la pantalla Standards (Estándares), escriba el número de puntos y réplicas de todas las curvas estándar de la placa de reacción. Para cada curva estándar, escriba la cantidad inicial y seleccione el factor de dilución.

Acerca del experimento de ejemplo

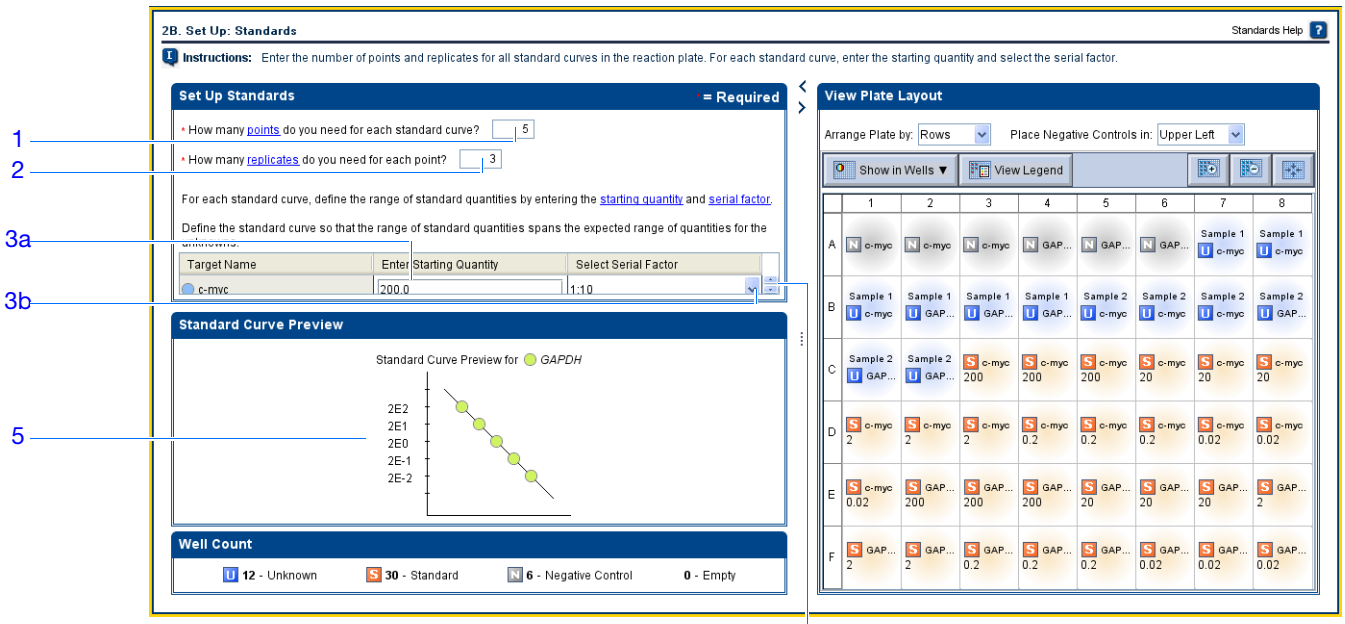
En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Se configura una curva estándar para el gen diana (c-myc). El estándar que se utiliza para la dilución seriada es una muestra de cDNA de una muestra de concentración conocida preparada a partir de RNA aislado de pulmón.
- Se configura una curva estándar para el control endógeno (GAPDH). El estándar que se utiliza para la dilución seriada es una muestra de cDNA de una muestra de concentración conocida preparada a partir de RNA aislado de pulmón.
- Para cada curva estándar:
  - Se utilizan cinco puntos en la curva estándar.
  - Se utilizan tres réplicas para cada punto. Las réplicas son reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos.
  - La cantidad inicial es 200 ng y el factor de dilución es 1:10.

Pantalla Standards (Estándares)

1. Haga clic en el campo **How many points do you need for each standard curve?** (¿Cuántos puntos necesita por cada curva estándar?) y, a continuación, escriba **5**.
2. Haga clic en el campo **How many replicates do you need for each point?** (¿Cuántas réplicas necesita para cada punto?) y, a continuación, escriba **3**.
3. Defina el rango de cantidades estándar para el ensayo de c-myc:
   a. Haga clic en el campo **Enter Starting Quantity** (Escriba cantidad inicial) y, a continuación, escriba **200**.
   b. En el menú desplegable Select Serial Factor (Seleccionar factor de dilución), seleccione **1:10**.
4. Defina el rango de cantidades estándar para el ensayo de GAPDH:
   a. Haga clic en el campo **Enter Starting Quantity** (Escriba cantidad inicial) y, a continuación, escriba **200**.
   b. En el menú desplegable Select Serial Factor (Seleccionar factor de dilución), seleccione **1:10**.
5. Revise el panel Standard Curve Preview (Vista previa de la curva estándar) para cada ensayo. La curva estándar tiene los siguientes puntos: 200, 20, 2, 0,2 y 0,02.
6. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas


1
2
3a
3b
5
2B. Set Up: Standards
Standards Help
Instructions: Enter the number of points and replicates for all standard curves in the reaction plate. For each standard curve, enter the starting quantity and select the serial factor.
Set Up Standards
= Required
How many points do you need for each standard curve? 5
How many replicates do you need for each point? 3
For each standard curve, define the range of standard quantities by entering the starting quantity and serial factor.
Define the standard curve so that the range of standard quantities spans the expected range of quantities for the
Target Name
Enter Starting Quantity
Select Serial Factor
c-myc
200.0
1:10
Standard Curve Preview
Standard Curve Preview for GAPDH
2E2
2E1
2E0
2E-1
2E-2
Well Count
12 - Unknown
30 - Standard
6 - Negative Control
0 - Empty
View Plate Layout
Arrange Plate by: Rows
Place Negative Controls in: Upper Left
Show in Wells
View Legend

Si es necesario, utilice la barra de desplazamiento para ver el GAPDH y, a continuación, realice los pasos 4a y 4b.

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- Configure una curva estándar para cada gen diana de la placa de reacción. Los genes diana se definen previamente en la pantalla Targets (Dianas) ("Configuración de los genes diana" en la página 25).
- Escriba el número de puntos para cada curva estándar de la placa de reacción. Applied Biosystems recomienda al menos cinco puntos de dilución por cada curva estándar.
- Escriba el número de reacciones idénticas (réplicas) para cada punto de la curva estándar. Applied Biosystems recomienda tres réplicas para cada punto.
- Dado que el rango de cantidades estándar afecta al cálculo de la eficiencia de la amplificación, estudie cuidadosamente el rango de cantidades estándar apropiado para su ensayo:
  - Para obtener medidas más precisas de la eficiencia de la amplificación, utilice un amplio rango de cantidades estándar, de entre 5 y 6 órdenes de magnitud. Si especifica un amplio rango de cantidades para los estándares, debe utilizar un producto de PCR o un molde muy concentrado como, por ejemplo, un cDNA clonado.
  - Si tiene una cantidad limitada de molde de cDNA y/o si el gen diana es un tránscrito de bajo número de copias, o se sabe que está en un rango determinado, puede que sea necesario un rango menor de cantidades estándar.
- El factor de dilución sirve para calcular las cantidades de todos los puntos de la curva estándar. Si la cantidad inicial es la cantidad más alta, seleccione un factor de dilución como, por ejemplo, 1:2, 1:3, etc. Si la cantidad inicial es la cantidad menor, seleccione un factor de concentración como, por ejemplo, 2×, 3×, etc.

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Standards (Estándares), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- La eficiencia de la amplificación, consulte *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*.

Configuración de las muestras

En la pantalla Samples (Muestras), escriba el número de muestras, réplicas y controles negativos que va a incluir en la placa de reacción, escriba los nombres de las muestras y, a continuación, seleccione las reacciones de muestra/diana que va a configurar.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Se utilizan dos muestras: cDNA preparado a partir de RNA total aislado de hígado y riñón. Las muestras contienen cantidades desconocidas del gen c-myc (diana) y del gen GAPDH (control endógeno).
- Se utilizan tres réplicas. Las réplicas son reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos.
- Se utilizan tres controles negativos. Las reacciones de control negativo contienen agua en lugar de la muestra y no se deberían amplificar.

Pantalla Samples (Muestras)

1. Haga clic en el campo **How many samples do you want to test in the reaction plate?** (Cuántas muestras desea probar en la placa de reacción?) y, a continuación, escriba **2**.

   Nota: El número de filas de la tabla de las muestras se actualiza con el número que escriba.

2. Haga clic en el campo **How many replicates do you need?** (¿Cuántas réplicas necesita?) y, a continuación, escriba **3**.
3. Haga clic en el campo **How many negative controls do you need for each target assay?** (¿Cuántos controles negativos necesita para cada ensayo diana?) y, a continuación, escriba **3**.
4. Configure la muestra 1:
   a. Haga clic en el campo **Enter Sample Name** (Escriba nombre de muestra) y, a continuación, escriba **Liver** (Hígado).
   b. Deje la opción predeterminada en el campo Color.
5. Configure la muestra 2:
   a. Haga clic en el campo **Enter Sample Name** (Escriba nombre de muestra) y, a continuación, escriba **Kidney** (Riñón).
   b. Deje la opción predeterminada en el campo Color.

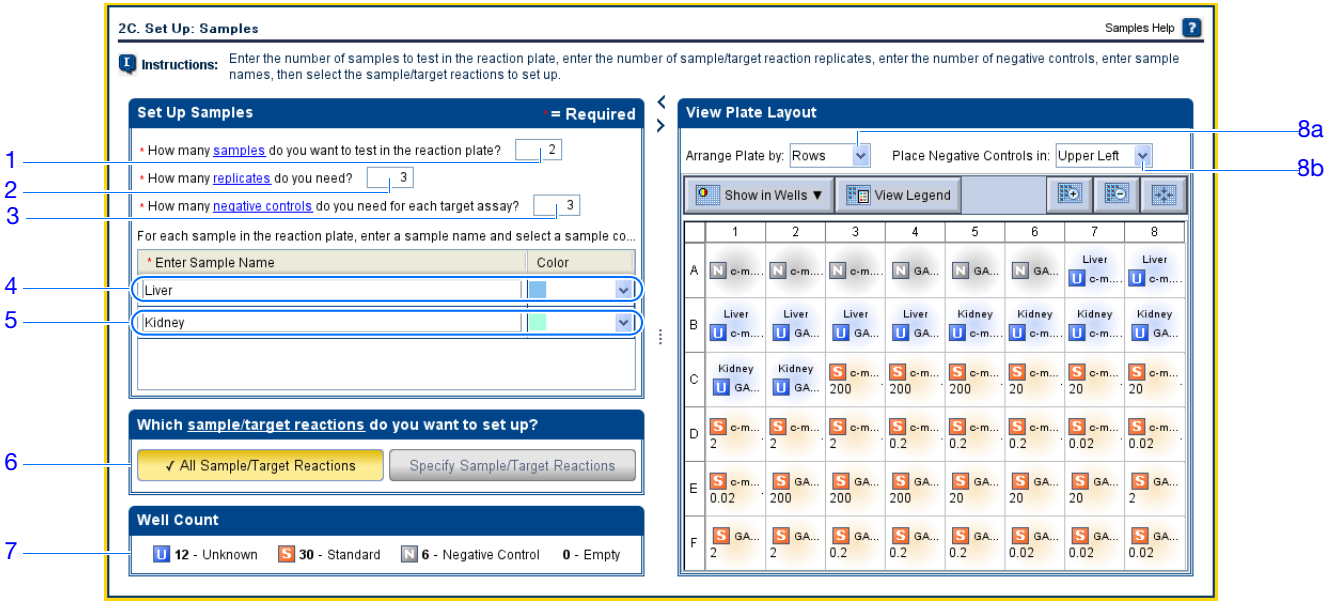
Notas

6. Seleccione **All Sample/Target Reactions** (Todas las reacciones de muestra/diana) para configurar todos los genes diana de todas las muestras.

7. En el panel Well Count (Número de pocillos), confirme que hay:
   - 12 pocillos desconocidos U
   - 30 pocillos estándar S
   - 6 pocillos de control negativo N
   - 0 pocillos vacíos

8. En la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa):
   a. En el menú desplegable Arrange Plate by (Ordenar placa por), seleccione **Rows** (Filas) (predeterminado).
   b. En el menú desplegable Place Negative Controls (Colocar controles negativos), seleccione **Upper Left** (Superior izquierda) (predeterminado).

9. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.


2C. Set Up: Samples
Samples Help
Instructions: Enter the number of samples to test in the reaction plate, enter the number of sample/target reaction replicates, enter the number of negative controls, enter sample names, then select the sample/target reactions to set up.
Set Up Samples
* = Required
* How many samples do you want to test in the reaction plate? 2
* How many replicates do you need? 3
* How many negative controls do you need for each target assay? 3
For each sample in the reaction plate, enter a sample name and select a sample co...
* Enter Sample Name
Color
Liver
Kidney
Which sample/target reactions do you want to set up?
✓ All Sample/Target Reactions
Specify Sample/Target Reactions
Well Count
12 - Unknown
30 - Standard
6 - Negative Control
0 - Empty
View Plate Layout
Arrange Plate by: Rows
Place Negative Controls in: Upper Left
Show in Wells
View Legend
1
2
3
4
5
6
7
8a
8b

Notas

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- Identifique cada muestra con un nombre y un color únicos. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Sample Name (Nombre de muestra).
- Escriba el número de reacciones idénticas (réplicas) que desea configurar. Applied Biosystems recomienda tres réplicas para cada reacción de muestra.
- Escriba el número de reacciones de control negativo que desea configurar. Applied Biosystems recomienda tres reacciones de control negativo por cada ensayo diana.
- Seleccione la combinación de reacciones de muestra/diana deseada:
  - Seleccione **All Sample/Target Reactions** (Todas las reacciones de muestra/diana) para configurar todos los genes diana de todas las muestras.
  - Seleccione **Specify Sample/Target Reactions** (Especifique reacciones de muestra/diana) para configurar de uno en uno los genes diana que se van a amplificar en cada muestra.

Nota: En el asistente de diseño, cada reacción de PCR sólo puede contener una muestra y un ensayo diana.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Samples (Muestras) , acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Configuración de las opciones de cuantificación relativa

En la pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa), seleccione la muestra de referencia y el control endógeno para realizar la cuantificación relativa.

Acerca del experimento de ejemplo

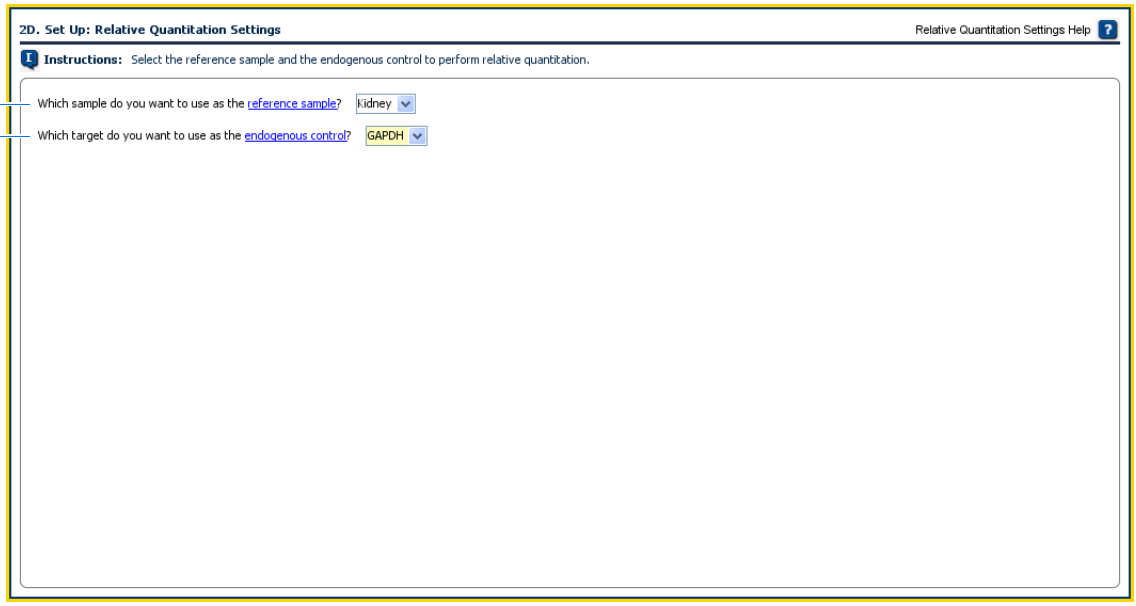
En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- El tejido del riñón se utiliza como muestra de referencia.
- GAPDH se utiliza como control endógeno.

Pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa)

1. En el menú desplegable Which sample do you want to use as the reference sample? (¿Qué muestra desea utilizar como muestra de referencia?), seleccione **Kidney** (Riñón).
2. En el menú desplegable Which target do you want to use as the endogenous control? (¿Qué diana desea utilizar como control endógeno?), seleccione **GAPDH**.
3. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas


2D. Set Up: Relative Quantitation Settings
Relative Quantitation Settings Help
Instructions: Select the reference sample and the endogenous control to perform relative quantitation.
1
Which sample do you want to use as the reference sample? Kidney
2
Which target do you want to use as the endogenous control? GAPDH

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- Seleccione una muestra de referencia entre las muestras creadas anteriormente ("Configuración de las muestras" en la página 30). Los resultados de la amplificación de las muestras se comparan con los resultados de la amplificación de la muestra de referencia para determinar la expresión relativa.
- Seleccione un control endógeno en los ensayos diana creados previamente ("Configuración de los genes diana" en la página 25). Los resultados de la amplificación del control endógeno se utilizan para normalizar los resultados de la amplificación de el gen diana para corregir las diferencias en la cantidad de molde añadida a cada reacción.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- Muestras de referencia (también denominadas calibradores) y controles endógenos, consulte *User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression*.

Configuración del protocolo de termociclado

En la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado), revise el volumen de la reacción y el perfil térmico del protocolo de termociclado predeterminado. Si es necesario, puede editar el protocolo de termociclado predeterminado o sustituirlo por otro de la biblioteca Run Method (Protocolo de termociclado).

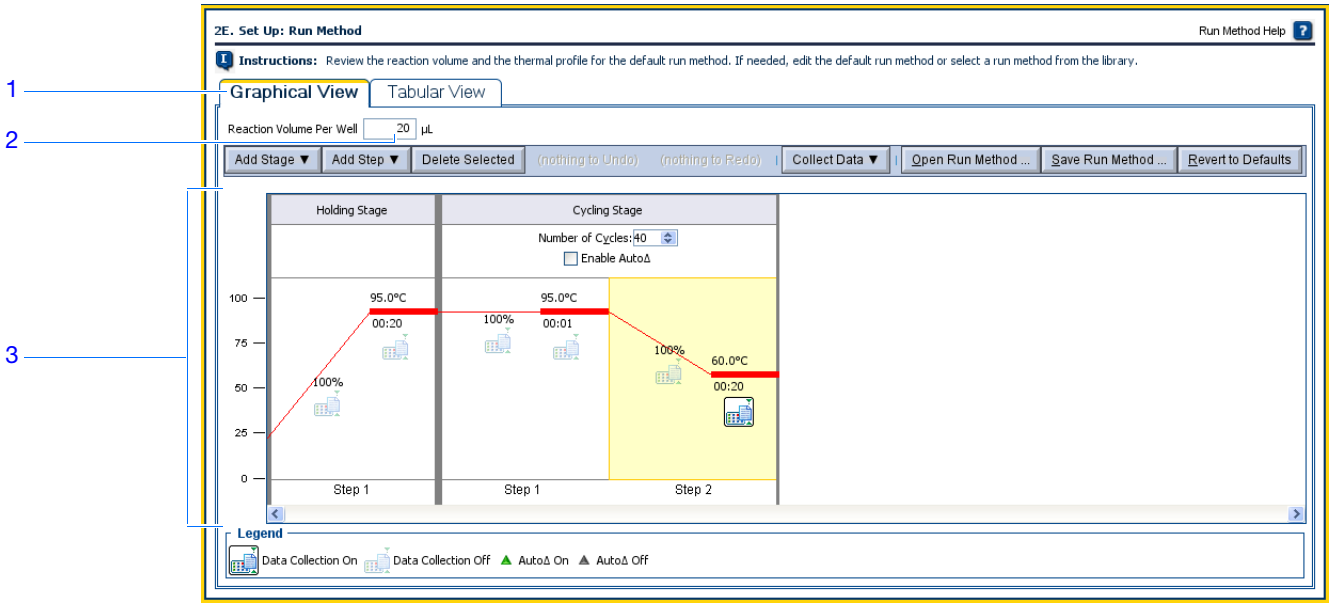
Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, se utiliza el protocolo de termociclado predeterminado sin modificaciones.

Notas

Revisión de la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado)

1. Haga clic en la ficha **Graphical View** (Vista gráfica) (predeterminada) o **Tabular View** (Vista tabular).
2. Asegúrese de que en el campo Reaction Volume Per Well (Volumen de reacción por pocillo) aparece **20 µL**.
3. Asegúrese de que en el perfil térmico aparecen las etapas y los ciclos que se indican a continuación.
4. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.



Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- Escriba un número entre 10 y 30 para el volumen de reacción/pocillo. El sistema StepOne admite volúmenes de reacción de entre 10 y 30 µL.
- Revise el perfil térmico:
  - Asegúrese de que el perfil térmico es apropiado para los reactivos.
  - Si va a realizar una RT-PCR de 1 paso, incluya un paso de retrotranscripción.

  Si el experimento necesita un perfil térmico diferente, modifique el perfil térmico o cambie el protocolo de termociclado por otro de la biblioteca Run Method (Protocolo de termociclado). La biblioteca Run Method (Protocolo de termociclado) está incluida en el software StepOne.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la biblioteca Run Method (Protocolo de termociclado) o acerca de la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Revisión de la configuración de la reacción

En la pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción), seleccione el tipo de ensayo (si utiliza reactivos TaqMan) y, a continuación, revise los volúmenes calculados para preparar las reacciones de PCR, las series de dilución estándar y las diluciones de las muestras. Si es necesario, puede editar el volumen de reacción, el volumen de reacción de exceso, las concentraciones de los reactivos, la concentración del estándar y/o la concentración de la muestra diluida.

¡IMPORTANTE! Realice estos pasos para cada ensayo diana de la placa de reacción.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Se utilizan Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays.
- El volumen de reacción por pocillo es 20 µL.
- El volumen de reacción de exceso es del 10%.
- Los componentes de la reacción son:
  - TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×)
  - Ensayo de c-myc (20×)
  - Ensayo de GAPDH (20×)
  - Muestra o estándar
  - Agua
- La concentración del estándar en la solución de partida es de 200 ng/µL.
- La concentración de la muestra diluida es de 5,0 ng/µL.
- La concentración de la solución de partida de la muestra es de 100 ng/µL.

Pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción)

Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de c-myc

1. Seleccione la ficha **Reaction Mix Calculations** (Cálculos de la mezcla de reacción) (predeterminada).
2. En el panel Select Target (Seleccionar diana), seleccione **c-myc**.
3. En el menú desplegable Assay Type (Tipo de ensayo), seleccione **Inventoried/Made to Order** (En inventario/Fabricado bajo pedido).
4. Asegúrese de que en el campo Reaction Volume Per Well (Volumen de reacción por pocillo) aparece **20 µL**.
5. Asegúrese de que en el campo Excess Reaction Volume (Volumen de reacción en exceso) muestra **10%**.
6. En el panel Reactions for c-myc (Reacciones para c-myc):
   a. Asegúrese de que en el campo Master Mix Concentration (Concentración de mezcla maestra) aparece **2×**.

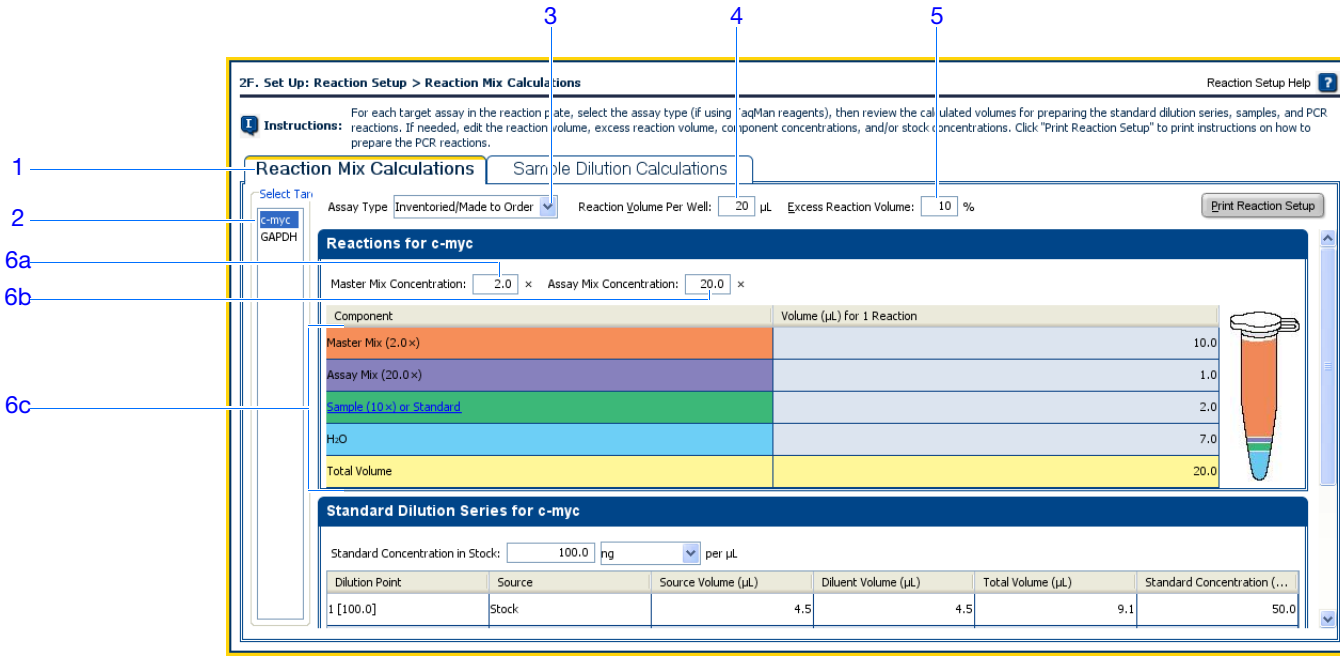
Notas

b. Asegúrese de que en el campo Assay Mix Concentration (Concentración de ensayo) aparece **20**×.

c. Revise los componentes y los volúmenes calculados para las reacciones de PCR:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción
Mezcla maestra (2×)	10,0
Ensayo (20×)	1,0
Muestra (10×) o estándar	2,0‡
H_2O	7,0
Volumen total	20,0

‡ El volumen de la muestra o estándar se limita al 10% del volumen total de la reacción.



7. En el panel Standard Dilution Series for c-myc (Dilución seriada estándar para c-myc):

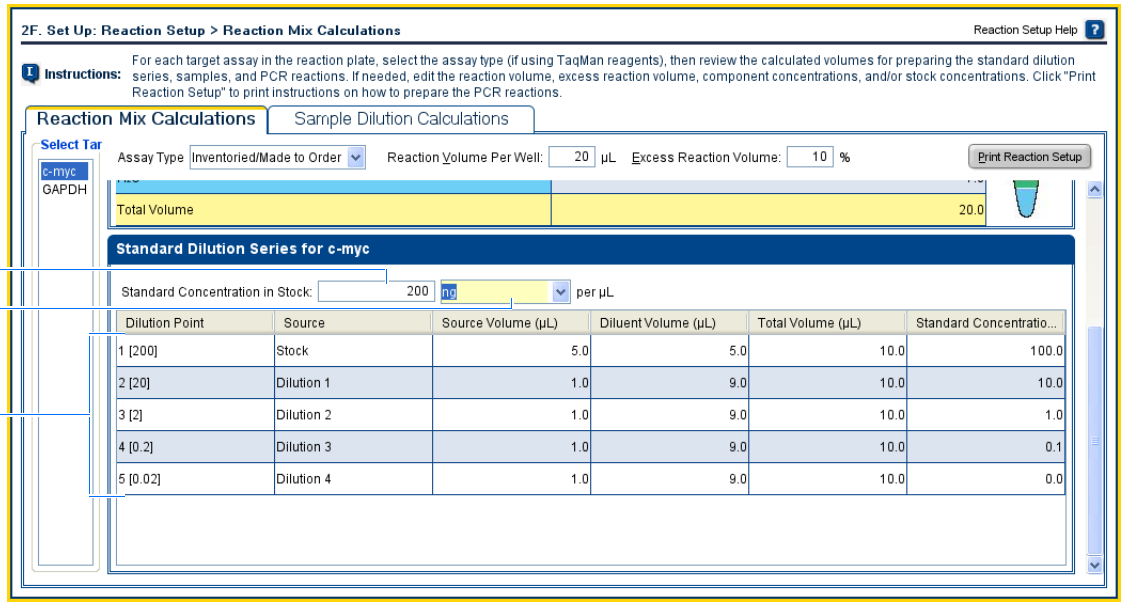
a. Haga clic en el campo **Standard Concentration in Stock** (Concentración del estándar en la solución de partida) y, a continuación, escriba **200**.

b. En el campo de las unidades, seleccione **ng** per µL (ng por L) (predeterminado) en el menú desplegable.

c. Revise los volúmenes calculados para preparar la dilución seriada:

Notas

Dilución	Solución origen	Volumen de solución origen (µL)	Volumen de disolvente (µL)	Volumen total (µL)	Concentración del estándar (ng/µL)
1 [200]	Solución origen	5,0	5,0	10,0	100,0
2 [20]	Dilución 1	1,0	9,0	10,0	10,0
3 [2]	Dilución 2	1,0	9,0	10,0	1,0
4 [0,2]	Dilución 3	1,0	9,0	10,0	0,1
5 [0,02]	Dilución 4	1,0	9,0	10,0	0,01



Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de GAPDH

1. Seleccione la ficha **Reaction Mix Calculations** (Cálculos de la mezcla de reacción) (predeterminada).
2. En el panel Select Target (Seleccionar diana), seleccione **GAPDH**.
3. En el menú desplegable Assay Type (Tipo de ensayo), seleccione **Inventoried/Made to Order** (En inventario/Fabricado bajo pedido).
4. Asegúrese de que en el campo Reaction Volume Per Well (Volumen de reacción por pocillo) aparece **20 µL**.
5. Asegúrese de que en el campo Excess Reaction Volume (Volumen de reacción en exceso) muestra **10%**.

Notas

6. En el panel Reactions for GAPDH (Reacciones para GAPDH):

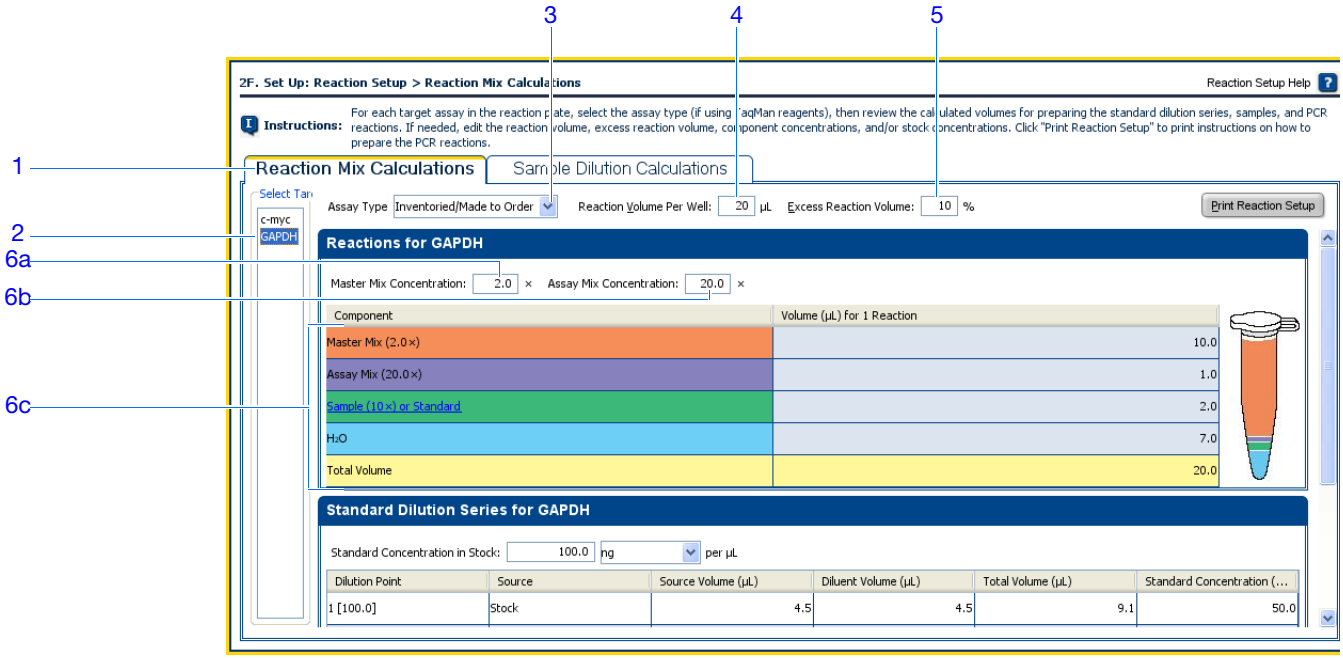
   a. Asegúrese de que en el campo Master Mix Concentration (Concentración de mezcla maestra) aparece **2**X.

   b. Asegúrese de que en el campo Assay Mix Concentration (Concentración de ensayo) aparece **20**X.

   c. Revise los componentes y los volúmenes calculados para las reacciones de PCR:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción
Mezcla maestra (2X)	10,0
Ensayo (20X)	1,0
Muestra (10X) o estándar	2,0‡
H_2O	7,0
Volumen total	20,0

‡ El volumen de la muestra o estándar se limita al 10% del volumen total de la reacción.



7. En el panel Standard Dilution Series for GAPDH (Dilución seriada estándar para GAPDH):

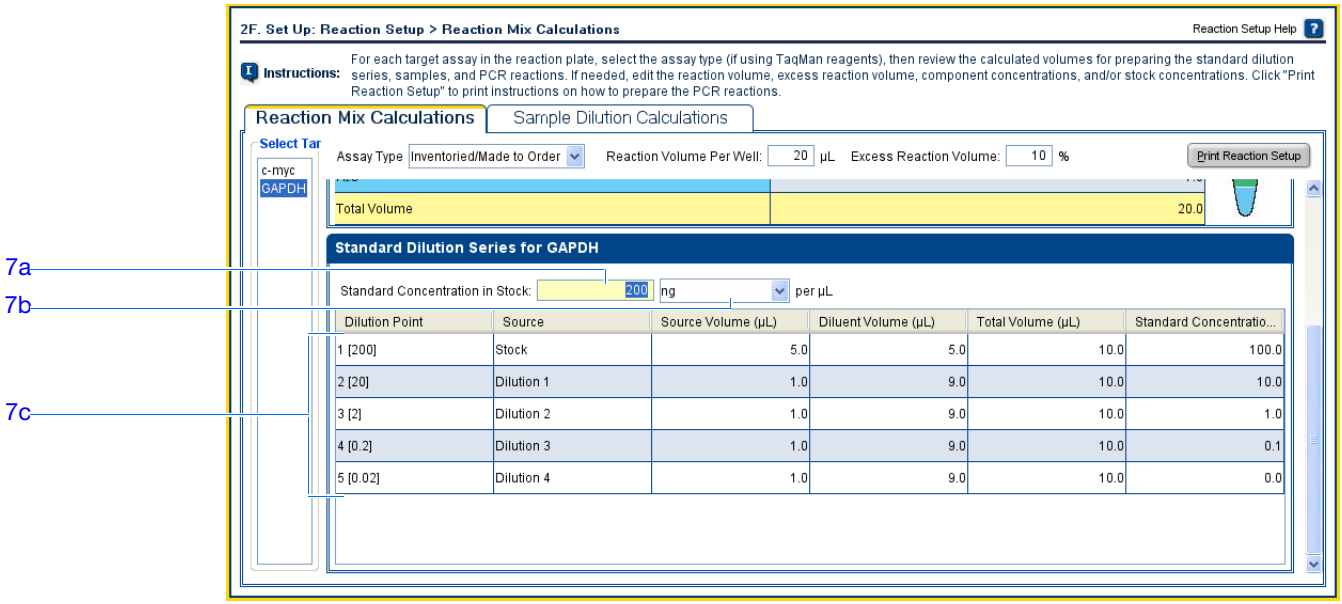
   a. Haga clic en el campo **Standard Concentration in Stock** (Concentración del estándar en solución de partida) y, a continuación, escriba **200**.

   b. En el campo de las unidades, seleccione **ng** per µL (ng por L) (predeterminado) en el menú desplegable.

Notas

c. Revise los volúmenes calculados para preparar la dilución seriada:

Dilución	Solución origen	Volumen de solución origen (µL)	Volumen de disolvente (µL)	Volumen total (µL)	Concentración del estándar (ng/µL)
1 [200]	Solución origen	5,0	5,0	10,0	100,0
2 [20]	Dilución 1	1,0	9,0	10,0	10,0
3 [2]	Dilución 2	1,0	9,0	10,0	1,0
4 [0,2]	Dilución 3	1,0	9,0	10,0	0,1
5 [0,02]	Dilución 4	1,0	9,0	10,0	0,01



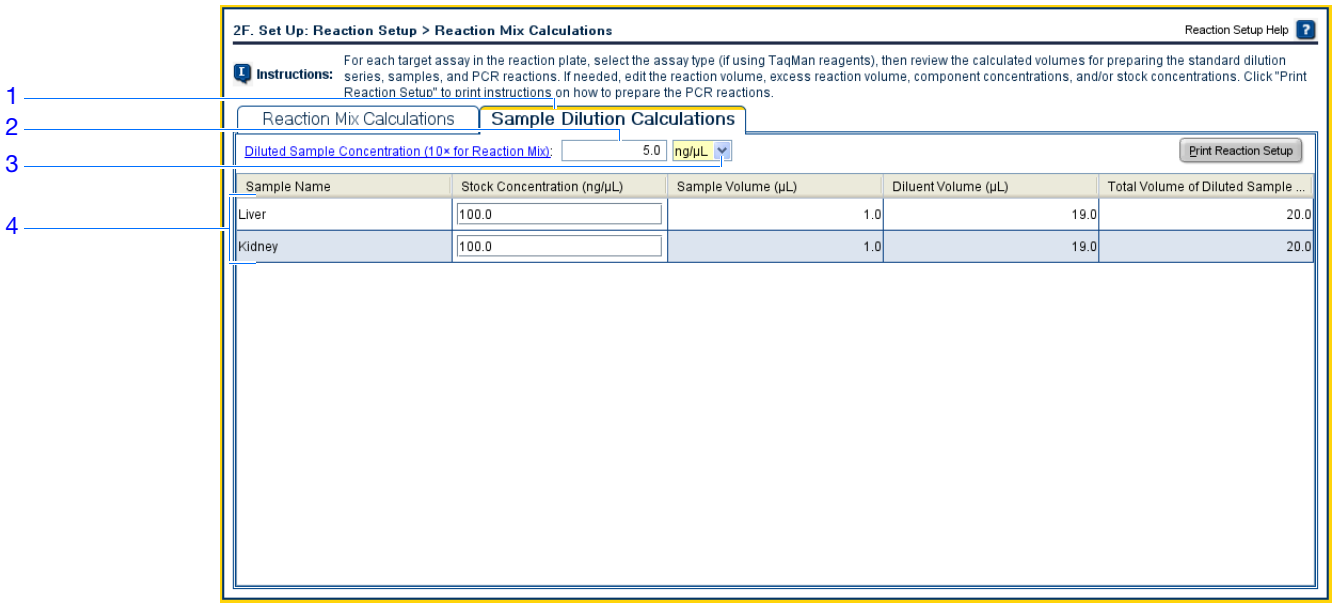
Complete la ficha Sample Dilution Calculations (Cálculos de la dilución de muestra)

1. Seleccione la ficha **Sample Mix Calculations** (Cálculos de la mezcla de muestra).
2. Haga clic en el campo **Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix)** (Concentración de muestra diluida (10X por mezcla de reacción)) y, a continuación, escriba **5,0**.
3. En el menú desplegable de la unidad, seleccione **ng/µL** (predeterminado).

Notas

4. Revise los volúmenes calculados para las diluciones de las muestras:

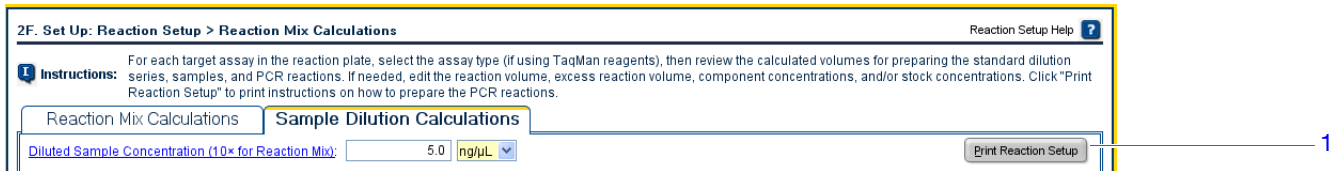
Nombre de la muestra	Concentración de la solución origen (ng/µL)	Volumen de muestra (µL)	Volumen de disolvente (µL)	Volumen total de muestra diluida (µL)
Hígado	100,0	1,0	19,0	20,0
Riñón	100,0	1,0	19,0	20,0


2F. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations
Reaction Setup Help
Instructions:
For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.
Reaction Mix Calculations
Sample Dilution Calculations
Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix):
5.0
ng/µL
Print Reaction Setup
Sample Name
Stock Concentration (ng/µL)
Sample Volume (µL)
Diluent Volume (µL)
Total Volume of Diluted Sample ...
Liver
100.0
1.0
19.0
20.0
Kidney
100.0
1.0
19.0
20.0
1
2
3
4

Imprima las instrucciones de la configuración de la reacción

Imprima las instrucciones detalladas de la configuración de la reacción y, a continuación, guárdelas para el Capítulo 3, “Preparación de las reacciones de la curva estándar relativa.”

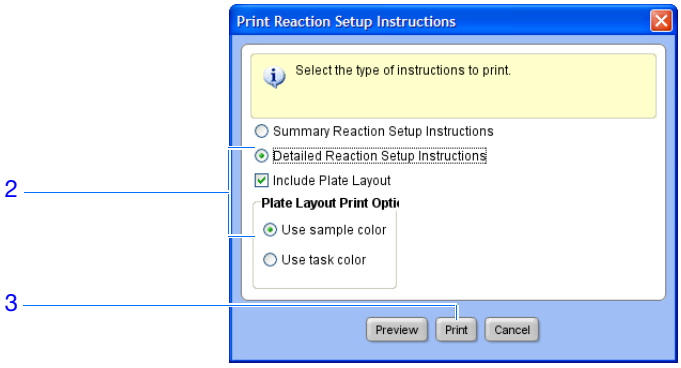
1. Haga clic en **Print Reaction Setup** (Imprimir configuración de reacción).


2F. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations
Reaction Setup Help
Instructions:
For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.
Reaction Mix Calculations
Sample Dilution Calculations
Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix):
5.0
ng/µL
Print Reaction Setup
1

2. En el cuadro de diálogo, seleccione:
   - **Detailed Reaction Setup Instructions** (Instrucciones detalladas de la configuración de la reacción)
   - **Include Plate Layout** (Incluir disposición de la placa)
   - **Use sample color** (Utilizar color de muestra)

Notas

3. Haga clic en **Print** (Imprimir).



4. En el cuadro de diálogo Print (Imprimir), seleccione la impresora y las opciones de impresión y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).

5. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- Si utiliza reactivos TaqMan, seleccione el tipo de ensayo que va a utilizar:
  - Seleccione **Inventoried/Made to Order** (En inventario/Fabricado bajo pedido) si utiliza Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays (en inventario o fabricados bajo pedido) o Applied Biosystems Custom TaqMan® Gene Expression Assays.
  - Seleccione **Custom** (Personalizado) si va a diseñar sus propios ensayos con el software Primer Express®.
- Escriba un número entre 10 y 30 para el volumen de reacción/pocillo. El sistema StepOne admite volúmenes de reacción de entre 10 y 30 µL.
- Incluya el volumen de reacción en exceso para contabilizar la pérdida que se produce durante el pipeteo. Applied Biosystems recomienda un volumen de reacción en exceso de al menos el 10%.
- Revise las concentraciones de la mezcla de reacción para cada gen diana. Si es necesario:
  - Para los reactivos TaqMan, modifique las concentraciones de la mezcla maestra y del ensayo.
  - Para los reactivos SYBR Green, modifique las concentraciones de la mezcla maestra, el cebador directo y el cebador reverso.
  - Para la RT-PCR de 1 paso, modifique la concentración de retrotranscripción.
- Revise los componentes de la mezcla de reacción para cada gen diana:
  - Si va a trabajar de modo rápido, asegúrese de utilizar una mezcla maestra rápida en las reacciones de PCR.
  - Si va a realizar reacciones de PCR en modo estándar, asegúrese de utilizar una mezcla maestra tipo estándar en las reacciones de PCR.
  - En la RT-PCR de 1 paso, asegúrese de incluir retrotranscriptasa en las reacciones de PCR y de utilizar un tampón específico.

Notas

- Revise los cálculos de diluciones seriadas para cada gen diana. Si es necesario, modifique la concentración del estándar en la solución de partida (incluidas las unidades).

  Nota: En el campo de las unidades de Standard Concentration in Stock (Concentración del estándar de la solución de partida), puede seleccionar **ng** o µg en el menú desplegable o introducir otra unidad en el campo (por ejemplo, **copies** (copias), **IU** [unidades internacionales], **nmol**, **pg**, etc). La tabla se actualiza de la manera correspondiente.

- Revise los cálculos de la dilución de las muestras para cada muestra. Si es necesario, modifique la concentración de muestra diluida (incluidas las unidades) y la concentración de la solución de partida.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- Los ensayos de Applied Biosystems se refieren a:
  - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Notas

Solicitud de materiales para el experimento

En la pantalla Materials List (Lista de materiales), revise la lista de materiales que se recomiendan para preparar para la placa de reacción de PCR.

Opcionalmente, puede solicitar los materiales recomendados a la tienda en línea de Applied Biosystems. Cree una cesta de la compra, añada productos a la cesta de compra y, a continuación, inicie la sesión para enviar su pedido. Para acceder a la tienda en línea de Applied Biosystems, debe tener una conexión a Internet ilimitada.

Nota: El software StepOne recomienda los materiales que debe solicitar de acuerdo con el diseño del experimento. Se da por hecho que se va a diseñar el experimento, solicitar los materiales y luego preparar (Capítulo 3) y procesar (Capítulo 4) la placa de reacción cuando reciba los materiales.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, los materiales recomendados son:

- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2✕), No AmpErase® UNG
- Ensayo de c-myc: Hs00153408_m1 (RefSeq NM_002467.3)
- Ensayo de GAPDH: Hs99999905_m1 (RefSeq NM_002046.2)

Pantalla Ordering Materials (Solicitud de materiales)

1. Busque el ensayo diana en la tienda en línea de Applied Biosystems:
   a. Asegúrese de que el ordenador está conectado a Internet.
   b. Haga clic en el campo **Enter Gene Name** (Escriba el nombre del gen), escriba **c-myc** y, a continuación, haga clic en **Find Assay** (Buscar ensayo).
   c. En el cuadro de diálogo Find Assay Results (Buscar resultados de ensayo), seleccione la fila **Hs00153408_m1**.
   d. Haga clic en el campo **Enter Gene Name** (Escriba el nombre del gen), escriba **GAPDH** y, a continuación, haga clic en **Find Assay** (Buscar ensayo).
   e. En el cuadro de diálogo Find Assay Results (Buscar resultados de ensayo), seleccione la fila **Hs99999905_m1**.
   f. Haga clic en **Apply Assay Selection** (Aplicar selección de ensayo).
2. Complete el panel Experiment Materials List (Lista de materiales del experimento):
   a. En el menú desplegable Display (Visualización), seleccione **All Items** (Todos los elementos) (predeterminada) y, a continuación, revise los materiales recomendados. Si es necesario, utilice la barra de desplazamiento situada a la derecha para ver todos los elementos.

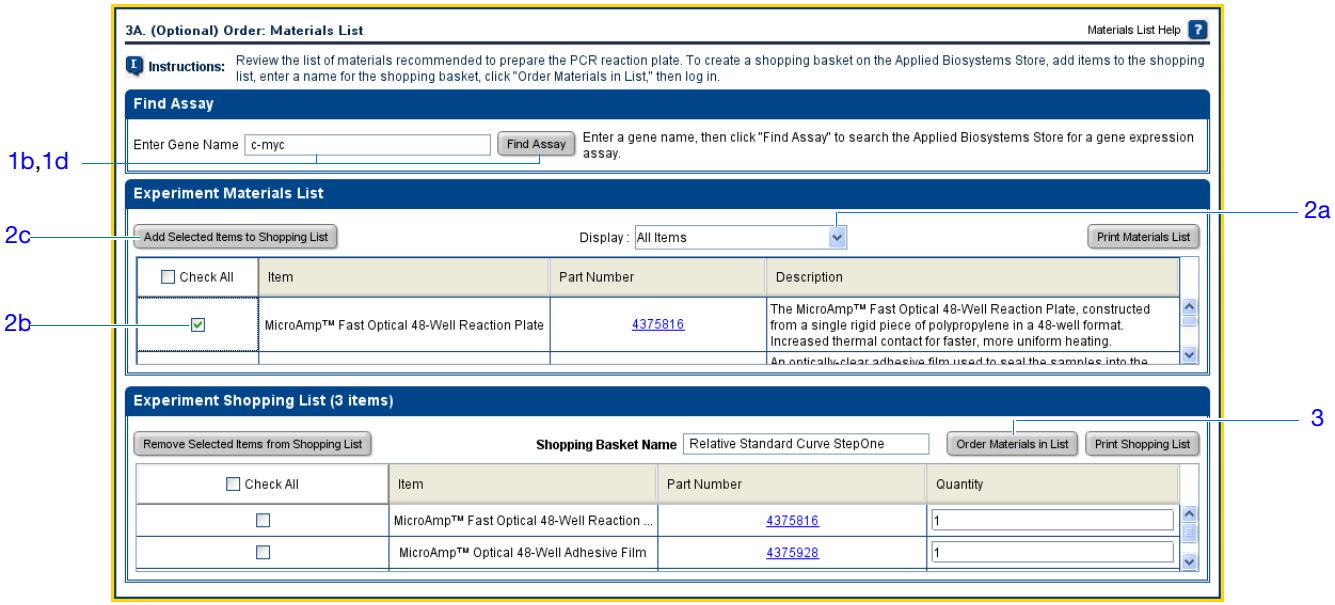
Notas

b. Active la casilla de verificación junto a cada uno de los siguientes elementos:
   - MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
   - MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
   - TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2✕), No AmpErase® UNG
   - Ensayo de c-myc: Hs00153408_m1 (RefSeq NM_002467.3)
   - Ensayo de GAPDH: Hs99999905_m1 (RefSeq NM_002046.2)

   Nota: Para obtener más información acerca de un elemento específico, haga clic en el vínculo del número de referencia para conectarse a la tienda en línea de Applied Biosystems. En la página de inicio, escriba el número de referencia en el campo Search (Búsqueda) y, a continuación, haga clic en **Go** (Ir).

c. Haga clic en **Add Selected Items to Shopping List** (Añadir elementos seleccionados a la cesta de compra).

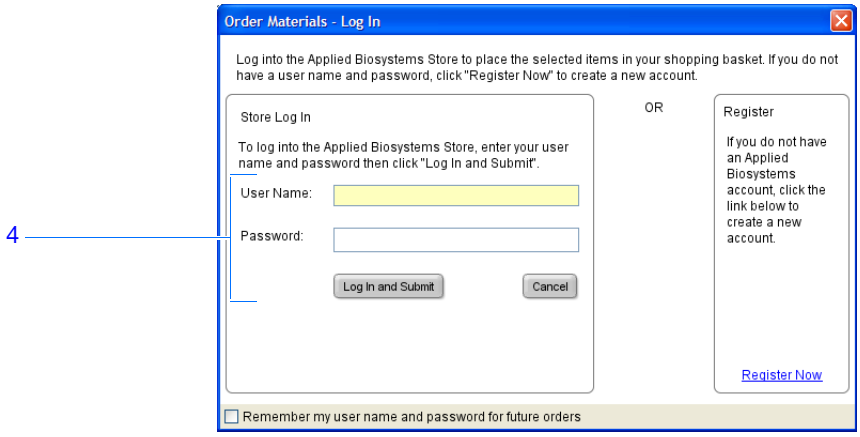
3. Compruebe si la cesta de compra del experimento contiene los materiales deseados y que las cantidades son correctas y, a continuación, haga clic en **Order Materials in List** (Solicitar materiales de la lista).


1b,1d
2c
2b
2a
3
3A. (Optional) Order: Materials List
Materials List Help
Instructions:
Review the list of materials recommended to prepare the PCR reaction plate. To create a shopping basket on the Applied Biosystems Store, add items to the shopping list, enter a name for the shopping basket, click "Order Materials in List," then log in.
Find Assay
Enter Gene Name
c-myc
Find Assay
Enter a gene name, then click "Find Assay" to search the Applied Biosystems Store for a gene expression assay.
Experiment Materials List
Add Selected Items to Shopping List
Display :
All Items
Print Materials List
Check All
Item
Part Number
Description
MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
4375816
The MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, constructed from a single rigid piece of polypropylene in a 48-well format. Increased thermal contact for faster, more uniform heating.
Experiment Shopping List (3 items)
Remove Selected Items from Shopping List
Shopping Basket Name
Relative Standard Curve StepOne
Order Materials in List
Print Shopping List
Check All
Item
Part Number
Quantity
MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction ...
4375816
1
MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
4375928
1

4. En el cuadro de diálogo, Order Materials - Log In (Solicitar materiales – Inicio de sesión), escriba el nombre de usuario y la contraseña de la tienda en línea de Applied Biosystems y, a continuación, haga clic en **Login and Submit** (Iniciar la sesión y enviar).

   Nota: Si no tiene cuenta en la tienda en línea de Applied Biosystems, haga clic en **Register Now** (Registrarse ahora) para crear una cuenta.

Notas


Order Materials - Log In
Log into the Applied Biosystems Store to place the selected items in your shopping basket. If you do not have a user name and password, click "Register Now" to create a new account.
Store Log In
To log into the Applied Biosystems Store, enter your user name and password then click "Log In and Submit".
User Name:
Password:
Log In and Submit
Cancel
OR
Register
If you do not have an Applied Biosystems account, click the link below to create a new account.
Register Now
Remember my user name and password for future orders
4

5. Después de realizar el pedido, haga clic en **Finish Designing Experiment** (Finalizar el diseño del experimento).

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- Confirme que el ordenador tiene una conexión a Internet ilimitada.
- Applied Biosystems recomienda las siguientes versiones de navegadores y Adobe® Acrobat® Reader para utilizar el sitio web de Applied Biosystems:

Sistema operativo del escritorio	Netscape® Navigator	Microsoft® Internet Explorer	Adobe® Acrobat® Reader
Windows® 98/NT/2000	v6.x o posterior	v6.x o posterior	v4.0 o posterior
Macintosh® OS 9 o posterior	v6.x o posterior	v5.2 o posterior	v4.0 o posterior

Nota: Asegúrese de que se han activado las cookies y Java Script para que el sitio web funcione correctamente.

- Seleccione todos los materiales que necesite para el experimento y añádalos a la cesta de compra.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Materials List (Lista de materiales), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

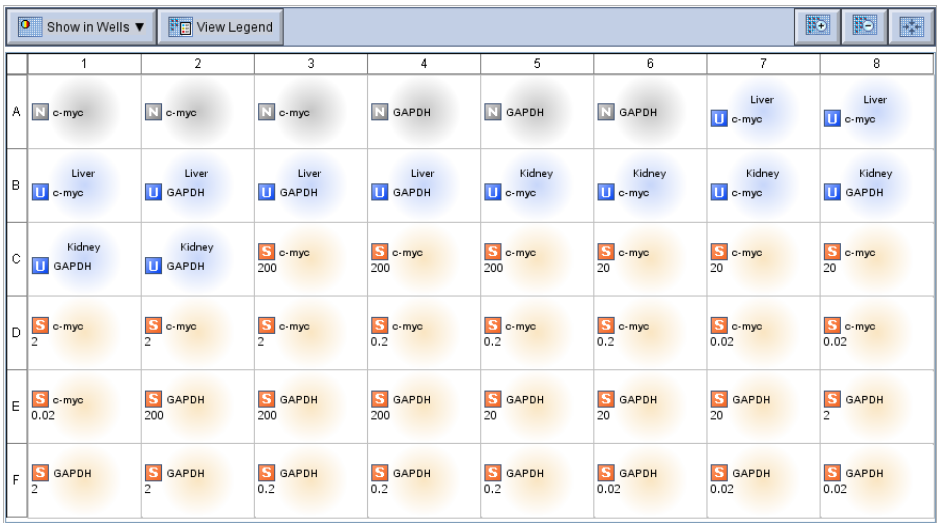
Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño

Para finalizar el flujo de trabajo del asistente de diseño, revise la disposición de la placa y, a continuación, seleccione una opción de salida.

Acerca del experimento de ejemplo

El software StepOne selecciona automáticamente ubicaciones para los pocillos en la placa de reacción. En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Los pocillos se colocan tal y como se muestra a continuación.


Show in Wells
View Legend
1 2 3 4 5 6 7 8
A N c-myc | N c-myc | N c-myc | N GAPDH | N GAPDH | N GAPDH | U Liver c-myc | U Liver c-myc
B U Liver c-myc | U Liver GAPDH | U Liver GAPDH | U Liver GAPDH | U Kidney c-myc | U Kidney c-myc | U Kidney c-myc | U Kidney GAPDH
C U Kidney GAPDH | U Kidney GAPDH | S c-myc 200 | S c-myc 200 | S c-myc 200 | S c-myc 20 | S c-myc 20 | S c-myc 20
D S c-myc 2 | S c-myc 2 | S c-myc 2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.02 | S c-myc 0.02
E S c-myc 0.02 | S GAPDH 200 | S GAPDH 200 | S GAPDH 200 | S GAPDH 20 | S GAPDH 20 | S GAPDH 20 | S GAPDH 2
F S GAPDH 2 | S GAPDH 2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.02 | S GAPDH 0.02 | S GAPDH 0.02

- El experimento se guarda tal y como está y se cierra.

Nota: Para el experimento de ejemplo, no realice el proceso en este momento.

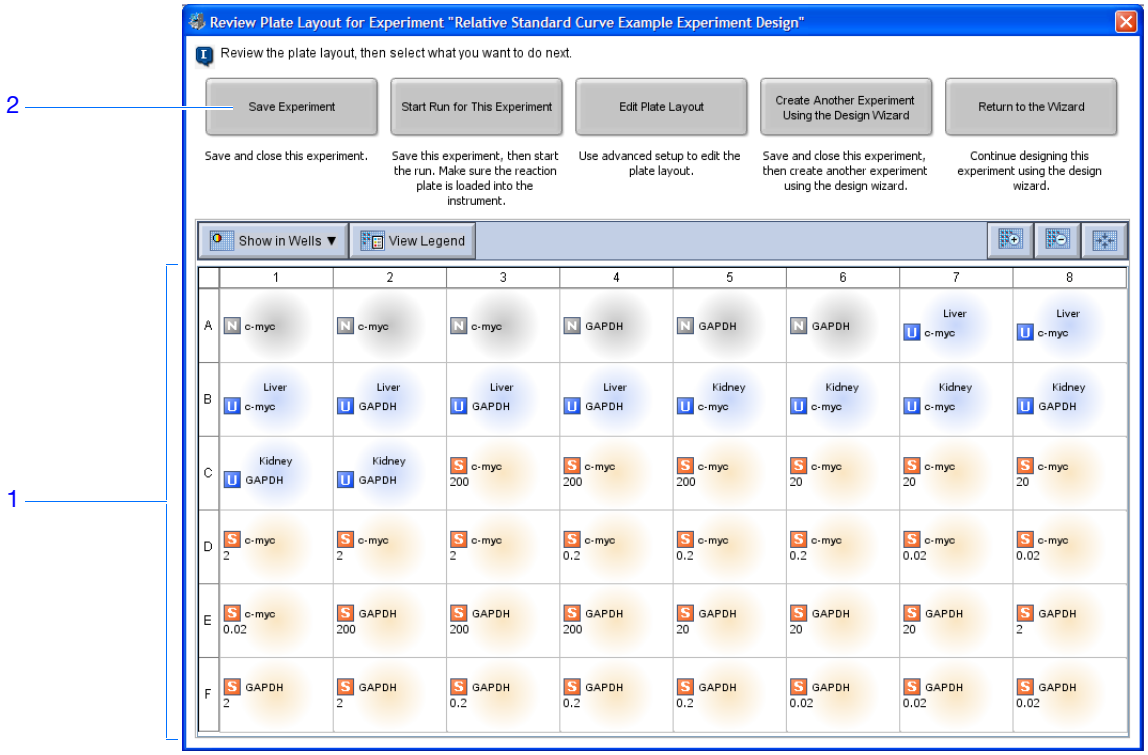
Finalización del asistente de diseño

1. En la ventana Review Plate for Experiment (Revisar placa para el experimento), revise la disposición de la placa. Asegúrese de que hay:
   - 12 pocillos desconocidos U
   - 30 pocillos estándar S
   - 6 pocillos de control negativo N
   - 0 pocillos vacíos

   Nota: Si la disposición de la placa es incorrecta, haga clic en **Return to the Wizard** (Volver al asistente) y compruebe los valores que ha introducido.

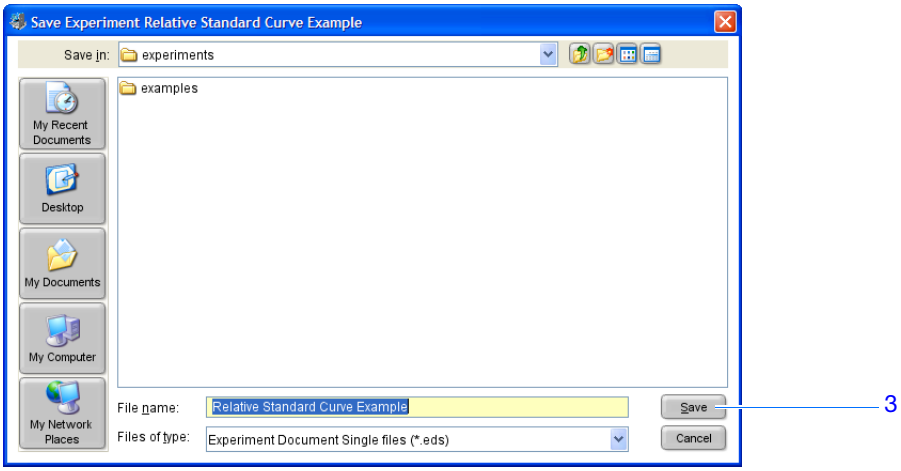
2. Haga clic en **Save Experiment** (Guardar experimento).

Notas


Review Plate Layout for Experiment "Relative Standard Curve Example Experiment Design"
Review the plate layout, then select what you want to do next.
Save Experiment
Start Run for This Experiment
Edit Plate Layout
Create Another Experiment Using the Design Wizard
Return to the Wizard
Save and close this experiment.
Save this experiment, then start the run. Make sure the reaction plate is loaded into the instrument.
Use advanced setup to edit the plate layout.
Save and close this experiment, then create another experiment using the design wizard.
Continue designing this experiment using the design wizard.
Show in Wells
View Legend
2
1

3. En el cuadro de diálogo Save Experiment (Guardar experimento), haga clic en **Save** (Guardar) para aceptar la ubicación y el nombre de archivo predeterminados. El experimento de ejemplo se guarda y se cierra, y regresa a la pantalla de inicio.

Nota: De manera predeterminada, el experimento de ejemplo se guarda en la carpeta Applied Biosystems\StepOne System\experiments.



Notas

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de curva estándar relativa:

- En la ventana Review Plate for Experiment (Revisar placa para el experimento), seleccione la opción de salida apropiada:
  - Haga clic en **Save Experiment** (Guardar experimento) si desea guardar y cerrar el experimento sin realizar ningún otro cambio ni iniciar el proceso.
  - Haga clic en **Start Run for This Experiment** (Iniciar proceso para este experimento) si desea guardar el experimento e iniciar el proceso. Asegúrese de que la placa de reacción está cargada en el instrumento.
  - Haga clic en **Edit Plate Layout** (Editar disposición de placa) si desea utilizar el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) para modificar la disposición de la placa.
  - Haga clic en **Create Another Experiment Using the Design Wizard** (Crear otro experimento con el asistente de diseño) si desea guardar y cerrar el experimento y, a continuación, crear otro experimento con el asistente de diseño.
  - Haga clic en **Return to the Wizard** (Regresar al asistente) si desea regresar al experimento para realizar cambios con el asistente de diseño.
- De manera predeterminada, los experimentos se guardan en la carpeta Applied Biosystems\StepOne System\experiments. Para cambiar:
  - La ubicación en la que se guarda un experimento específico, desplácese a la ubicación deseada con el cuadro de diálogo Save Experiment (Guardar experimento).
  - La ubicación en la que se guardan los experimentos de manera predeterminada, seleccione **Tools** (Herramientas) ▸ **Preferences** (Preferencias) y, a continuación, seleccione la ficha **General** (predeterminada). En el campo Default Data Folder (Carpeta de datos predeterminada), desplácese a la ubicación deseada.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca del uso del flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada), consulte "Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)" en la página 206.

Notas

3 Preparación de las reacciones de la curva estándar relativa

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Resumen del capítulo 50
- Preparación del molde 51
- Preparación de las diluciones de las muestras 53
- Preparación de la dilución seriada 55
- Preparación de la mezcla de reacción 58
- Preparación de la placa de reacción 61

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo preparar las reacciones de PCR para el experimentode curva estándar relativa de ejemplo y se ofrecen directrices para preparar las reacciones de PCR para su propio experimento de curva estándar relativa.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para preparar las reacciones de PCR para el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.

Experimento de curva estándar relativa

Inicio del experimento

▼

Diseño del experimento (Capítulo 2)

▼

Preparación de las reacciones (Capítulo 3)

1. Prepare el molde.
2. Prepare las diluciones de las muestras.
3. Prepare la dilución seriada.
4. Prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana.
5. Prepare la placa de reacción.

▼

Realización del experimento (Capítulo 4)

▼

Análisis del experimento (Capítulo 5)

▼

Fin del experimento

Notas

Preparación del molde

Prepare el molde para las reacciones de PCR (muestras y estándares) con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems recomienda utilizar High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit para realizar una retrotranscripción del cDNA a partir de RNA total. Los TaqMan® Gene Expression Assays se han diseñado utilizando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; no se han probado otros protocolos para los TaqMan Gene Expression Assays.

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, el molde para las reacciones de PCR es cDNA sintetizado a partir de las muestras de RNA total utilizando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Materiales necesarios

- Para las muestras, RNA total aislado de hígado y riñón
- Para los estándares, RNA total aislado de pulmón

Nota: Procure preparar el molde para las muestras y los estándares.

- Uno de los Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits:

Kit	Número de referencia
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 reacciones)	4368814
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (1000 reacciones)	4368813
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (200 reacciones)	4374966
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (1000 reacciones)	4374967

Nota: El High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit se llamaba antiguamente High-Capacity cDNA Archive Kit.

Notas

Preparación del molde

Utilice el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit para sintetizar cDNA de cadena sencilla a partir de las muestras de RNA total. Siga los procedimientos de *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* para:

1. Preparar la mezcla maestra de la reacción.

   PELIGRO QUÍMICO. El tampón de reacción 10X puede causar irritación de los ojos, la piel y las vías respiratorias. Consulte la ficha técnica de seguridad (MSDS) y siga las instrucciones de manipulación indicadas. Use protectores oculares, vestimenta protectora y guantes apropiados.

2. Prepare las reacciones de cDNA.
3. Realice la retrotranscripción en un termociclador.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar relativa:

- Applied Biosystems recomienda extraer primero el DNA o RNA del tejido o muestra.
- Applied Biosystems recomienda los siguientes moldes:
  - **cDNA (cDNA) complementario:** cDNA sintetizado a partir de las muestras de RNA total utilizando un High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.
  - **RNA:** RNA o mRNA total purificado extraído de un tejido o una muestra.
  - **DNA (gDNA) genómico:** gDNA purificado ya extraído de un tejido o una muestra.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La preparación de moldes de cDNA, consulte *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (PN 4375575). El protocolo no se incluye en los High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. Puede descargarlo desde el sitio web Applied Biosystems Documents on Demand:

  http://docs.appliedbiosystems.com/search.taf
- La preparación de moldes de RNA o gDNA, consulte el protocolo de los reactivos de purificación que haya seleccionado. Para localizar los reactivos de purificación de Applied Biosystems, visite el sitio web de Applied Biosystems:

  http://www.appliedbiosystems.com/

Notas

Preparación de las diluciones de las muestras

Realice diluciones de las muestras antes de añadir las muestras a la mezcla de reacción final. Diluya las muestras con los volúmenes que ha calculado el software StepOne™ ("Complete la ficha Sample Dilution Calculations (Cálculos de la dilución de muestra)" en la página 39).

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Las diluciones de las muestras son necesarias porque el volumen de las muestras se limita al 10% del volumen total de la reacción en el software StepOne. El volumen total de la reacción es de 20 µL/reacción, por lo que el volumen de las muestras es de 2 µL/reacción.
- La concentración de la solución de partida es de 100 ng/µL. Después de diluir la muestra de acuerdo con la tabla Sample Dilutions Calculations (Cálculos de diluciones de las muestras), la muestra tendrá una concentración de 5,0 ng/µL. Esto supone una concentración de 10× cuando se añaden 2 µL al volumen de mezcla de reacción final de 20 µL. Hay una concentración de 1× en la reacción final.
- Los volúmenes calculados en el software son:

Nombre de la muestra	Concentración de la solución origen (ng/µL)	Volumen de muestra (µL)	Volumen de disolvente (µL)	Volumen total de muestra diluida (µL)
Hígado	100,0	1,0	19,0	20,0
Riñón	100,0	1,0	19,0	20,0

Materiales necesarios

- Agua para diluir la muestra
- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Solución origen de las muestras
- Agitador
- Centrífuga

Preparación de las diluciones de las muestras

1. Etiquete un tubo de microcentrífuga diferente para cada muestra diluida:
   - **Hígado**
   - **Riñón**
2. Añada el volumen de agua requerido (disolvente) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de la muestra	Volumen de disolvente (µL)
1	Hígado	19,0
2	Riñón	19,0

Notas

3. Añada el volumen de solución de partida de las muestras requerido (muestra) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de la muestra	Volumen de muestra (µL)
1	Hígado	1,0
2	Riñón	1,0

4. Agite cada muestra diluida entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos.

5. Coloque las muestras diluidas en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar relativa:

- Podría necesitar diluciones de las muestras porque el volumen de las muestras se limita al 10% del volumen total de la reacción en el software StepOne. Debe realizar diluciones de las muestras antes de añadir las muestras a la mezcla de reacción final.
- Para conseguir un rendimiento óptimo de los TaqMan® Gene Expression Assays o los Custom TaqMan® Gene Expression Assays, utilice entre 10 y 100 ng de molde de cDNA por 20-µL de reacción. Para reactivos tipo rápido, Applied Biosystems recomienda 10 ng.
- Utilice tampón TE o agua para diluir la muestra.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de los ensayos de Applied Biosystems, consulte:

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Notas

Preparación de la dilución seriada

Prepare la dilución seriada con los volúmenes que ha calculado el software StepOne ("Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de c-myc" en la página 35 y "Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de GAPDH" en la página 37):

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- La concentración del estándar en la solución de partida es de 200 ng/µL.
- Los volúmenes calculados en el software para los ensayos de c-myc y GAPDH son:

Dilución	Solución origen	Volumen de solución origen (µL)	Volumen de disolvente (µL)	Volumen total (µL)	Concentración del estándar (ng/µL)
1 [200]	Solución origen	5,0	5,0	10,0	100,0
2 [20]	Dilución 1	1,0	9,0	10,0	10,0
3 [2]	Dilución 2	1,0	9,0	10,0	1,0
4 [0.2]	Dilución 3	1,0	9,0	10,0	0,1
5 [0.02]	Dilución 4	1,0	9,0	10,0	0,01

Materiales necesarios

- Agua para diluir los estándares
- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Solución de partida del estándar
- Agitador
- Centrífuga

Preparación de la dilución seriada para el ensayo de c-myc

1. Etiquete un tubo de microcentrífuga diferente para cada estándar:
   - **c-myc Std. 1**
   - **c-myc Std. 2**
   - **c-myc Std. 3**
   - **c-myc Std. 4**
   - **c-myc Std. 5**

Notas

2. Añada el volumen de agua requerido (disolvente) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de estándar	Volumen de disolvente que se debe añadir (µL)
1	c-myc Std. 1	5,0
2	c-myc Std. 2	9,0
3	c-myc Std. 3	9,0
4	c-myc Std. 4	9,0
5	c-myc Std. 5	9,0

3. Prepare la dilución 1 en el tubo c-myc Std. 1:
   a. Agite la solución de partida entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente el tubo.
   b. Con una punta de pipeta nueva, añada 5,0 µL de solución de partida al tubo c-myc Std. 1.
   c. Agite el tubo Std. 1 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
4. Prepare la dilución 2 en el tubo c-myc Std. 2:
   a. Con una punta de pipeta nueva, añada 1,0 µL de dilución al tubo c-myc Std. 2.
   b. Agite el tubo Std. 2 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
5. Prepare la dilución 3 en el tubo c-myc Std. 3:
   a. Con una punta de pipeta nueva, añada 1,0 µL de dilución al tubo c-myc Std. 3.
   b. Agite el tubo Std. 3 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
6. Prepare la dilución 4 en el tubo c-myc Std. 4:
   a. Con una punta de pipeta nueva, añada 1,0 µL de dilución al tubo c-myc Std. 4.
   b. Agite el tubo Std. 4 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
7. Prepare la dilución 5 en el tubo c-myc Std. 5:
   a. Con una punta de pipeta nueva, añada 1,0 µL de dilución al tubo c-myc Std. 5.
   b. Agite el tubo Std. 5 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
8. Coloque los estándares en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Notas

Preparación de la dilución seriada para el ensayo de GAPDH

1. Etiquete un tubo de microcentrífuga diferente para cada estándar:
   - **GAPDH Std. 1**
   - **GAPDH Std. 2**
   - **GAPDH Std. 3**
   - **GAPDH Std. 4**
   - **GAPDH Std. 5**
2. Añada el volumen de agua requerido (disolvente) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de estándar	Volumen de disolvente que se debe añadir (µL)
1	GAPDH Std. 1	5,0
2	GAPDH Std. 2	9,0
3	GAPDH Std. 3	9,0
4	GAPDH Std. 4	9,0
5	GAPDH Std. 5	9,0

3. Prepare la dilución 1 en el tubo GAPDH Std. 1:
   a. Agite la solución de partida entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente el tubo.
   b. Con una punta de pipeta nueva, añada 5,0 µL de solución de partida al tubo GAPDH Std. 1.
   c. Agite el tubo Std. 1 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
4. Prepare la dilución 2 en el tubo GAPDH Std. 2:
   a. Con una punta de pipeta nueva, añada 1,0 µL de dilución al tubo GAPDH Std. 2.
   b. Agite el tubo Std. 2 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
5. Prepare la dilución 3 en el tubo GAPDH Std. 3:
   a. Con una punta de pipeta nueva, añada 1,0 µL de dilución 2 al tubo GAPDH Std. 3.
   b. Agite el tubo Std. 3 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
6. Prepare la dilución 4 en el tubo GAPDH Std. 4:
   a. Con una punta de pipeta nueva, añada 1,0 µL de dilución 3 al tubo GAPDH Std. 4.

Notas

b. Agite el tubo Std. 4 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.

7. Prepare la dilución 5 en el tubo GAPDH Std. 5:
   a. Con una punta de pipeta nueva, añada 1,0 µL de dilución 4 al tubo GAPDH Std. 5.
   b. Agite el tubo Std. 5 entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifúguelo brevemente.
8. Coloque los estándares en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar relativa:

- Los estándares son esenciales para realizar un análisis preciso de los datos de la reacción.
- Cualquier error o imprecisión a la hora de realizar las diluciones afecta directamente a la calidad de los resultados.
- La calidad de pipetas y puntas, y el cuidado que se tenga a la hora de medir y mezclar las diluciones, afecta a la precisión.
- Utilice tampón TE o agua para diluir el estándar.

Preparación de la mezcla de reacción

Prepare la mezcla de reacción con los componentes y volúmenes que ha calculado el software StepOne ("Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de c-myc" en la página 35 y "Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de GAPDH" en la página 37).

Nota: El software calcula todos los componentes de las reacciones de PCR. Sin embargo, para preparar la mezcla de reacción de esta sección, incluya únicamente la mezcla maestra, el ensayo y agua. Añada la muestra o el estándar cuando prepare la placa de la reacción (consulte "Preparación de la placa de reacción" en la página 61).

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Los componentes de la mezcla de reacción son:
  - TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×)
  - Ensayo de c-myc (20×)
  - Ensayo de GAPDH (20×)
  - Agua

Notas

- Los volúmenes calculados en el software para ambos ensayos diana son:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción
Mezcla maestra (2X)	10,0
Ensayo (20X)	1,0
H_2O	7,0
Volumen total	18,0

Nota: En este momento, no se añade la muestra ni el estándar.

Materiales necesarios

- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Componentes de la mezcla de reacción (enumerados arriba)
- Centrífuga

Preparación de la mezcla de reacción

¡IMPORTANTE! Prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana por separado.

1. Etiquete un tubo del tamaño apropiado para cada mezcla de reacción:
   - **Mezcla de reacción para c-myc**
   - **Mezcla de reacción para GAPDH**
2. Para el ensayo de c-myc, añada los volúmenes requeridos de cada componente al tubo de la mezcla de reacción de c-myc:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción	Volumen (µL) para 24 reacciones (más un exceso del 10%)
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X)	10,0	264,0
Ensayo de c-myc (20X)	1,0	26,4
Agua	7,0	184,8
Volumen total de la mezcla de reacción	18,0	475,2

Notas

3. Para el ensayo de GAPDH, añada los volúmenes requeridos de cada componente al tubo de la mezcla de reacción de GAPDH:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción	Volumen (µL) para 24 reacciones (más un exceso del 10%)
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X)	10,0	264,0
Ensayo de GAPDH (20X)	1,0	26,4
Agua	7,0	184,8
Volumen total de la mezcla de reacción	18,0	475,2

4. Para mezclar la mezcla de reacción de cada tubo, pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tápelos.
5. Centrifugue brevemente los tubos para quitar las burbujas de aire.
6. Coloque las mezclas de las reacciones en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar relativa:

- Si el experimento incluye más de un ensayo diana, prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana de manera separada.
- Incluya un volumen de exceso en los cálculos para compensar la pérdida que se produce durante las transferencias de reactivos. Applied Biosystems recomienda un volumen de exceso de al menos el 10%.
- Incluya todos los componentes requeridos.
- Prepare los reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Mantenga los ensayos protegidos de la luz, en el refrigerador, hasta que esté listo para usarlos. Una exposición excesiva a la luz puede afectar a las sondas fluorescentes.
- Antes de utilizarlo:
  - Dé vueltas al bote para mezclar bien la mezcla maestra.
  - Agite el ensayo para resuspenderlo y, a continuación, centrifugue brevemente el tubo.
  - Para descongelar las muestras congeladas, colóquelas en hielo. Una vez descongeladas, agite las muestras para resuspenderlas y, a continuación, centrifugue los tubos brevemente.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la preparación de la mezcla de reacción, consulte el protocolo apropiado para los reactivos que está utilizando en las reacciones de PCR:

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Notas

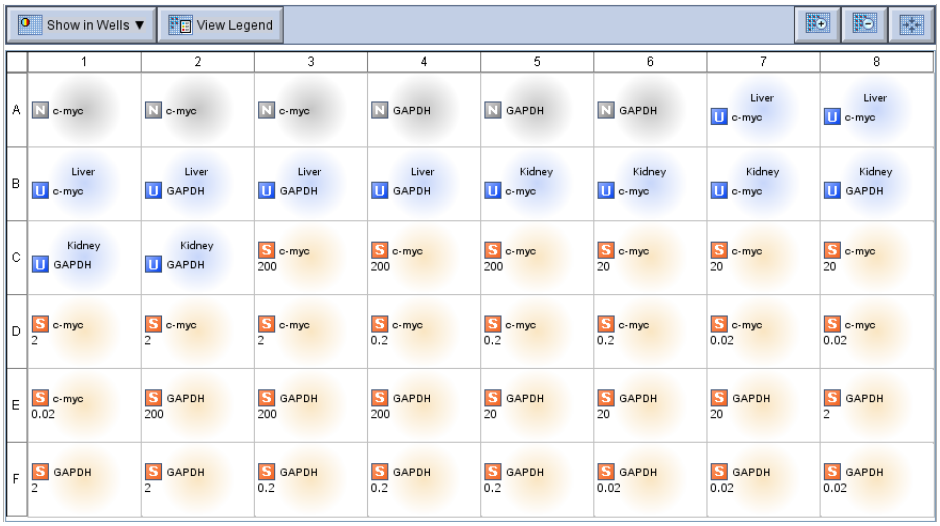
Preparación de la placa de reacción

Prepare las reacciones para cada grupo de réplicas y, a continuación, transfiéralas a la placa de reacción. Utilice la disposición de la placa que se muestra en el software StepOne.

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar relativa de ejemplo:

- Se utiliza una MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate.
- El volumen de la reacción es de 20 µL/pocillo.
- La placa de reacción contiene:
  - 12 pocillos desconocidos U
  - 30 pocillos estándar S
  - 6 pocillos de control negativo N
  - 0 pocillos vacíos
- Se utiliza la disposición de la placa que genera automáticamente el software StepOne:


Show in Wells
View Legend
1 2 3 4 5 6 7 8
A N c-myc | N c-myc | N c-myc | N GAPDH | N GAPDH | N GAPDH | U Liver c-myc | U Liver c-myc
B U Liver c-myc | U Liver GAPDH | U Liver GAPDH | U Liver GAPDH | U Kidney c-myc | U Kidney c-myc | U Kidney c-myc | U Kidney GAPDH
C U Kidney GAPDH | U Kidney GAPDH | S c-myc 200 | S c-myc 200 | S c-myc 200 | S c-myc 20 | S c-myc 20 | S c-myc 20
D S c-myc 2 | S c-myc 2 | S c-myc 2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.2 | S c-myc 0.02 | S c-myc 0.02
E S c-myc 0.02 | S GAPDH 200 | S GAPDH 200 | S GAPDH 200 | S GAPDH 20 | S GAPDH 20 | S GAPDH 20 | S GAPDH 2
F S GAPDH 2 | S GAPDH 2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.2 | S GAPDH 0.02 | S GAPDH 0.02 | S GAPDH 0.02

Materiales necesarios

- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Mezcla de reacción para c-myc (página 59)
- Mezcla de reacción para GAPDH (página 59)
- Agua
- Estándares de c-myc (página 55)
- Estándares de GAPDH (página 57)
- Muestras (página 53)
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film

Notas

- Centrífuga

Preparación de la placa de reacción

1. Para cada gen diana, prepare las reacciones de control negativo:
   a. A un tubo del tamaño apropiado, añada los volúmenes de la mezcla de reacción y de agua que se indican a continuación.

Tubo	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (µL)	Volumen de agua (µL)
1	Mezcla de reacción para c-myc	59,4	6,6
2	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	6,6

   b. Para mezclar la reacción, pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape el tubo.
   c. Centrifugue brevemente el tubo para quitar las burbujas de aire.
   d. Añada 20 µL de la reacción de control negativo a los pocillos apropiados de la placa de reacción.
2. Por cada grupo de réplicas, prepare las reacciones estándar:
   a. A tubos del tamaño adecuado, añada los volúmenes de la mezcla de reacción y de estándar que se indican a continuación.

Tubo	Reacción estándar	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (µL)	Estándar	Volumen de estándar (µL)
1	c-myc Std 1	Mezcla de reacción para c-myc	59,4	c-myc Std 1	6,6
2	c-myc Std 2	Mezcla de reacción para c-myc	59,4	c-myc Std 2	6,6
3	c-myc Std 3	Mezcla de reacción para c-myc	59,4	c-myc Std 3	6,6
4	c-myc Std 4	Mezcla de reacción para c-myc	59,4	c-myc Std 4	6,6
5	c-myc Std 5	Mezcla de reacción para c-myc	59,4	c-myc Std 5	6,6

Notas

Tubo	Reacción estándar	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (µL)	Estándar	Volumen de estándar (µL)
6	GAPDH Std 1	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	GAPDH Std 1	6,6
7	GAPDH Std 2	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	GAPDH Std 2	6,6
8	GAPDH Std 3	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	GAPDH Std 3	6,6
9	GAPDH Std 4	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	GAPDH Std 4	6,6
10	GAPDH Std 5	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	GAPDH Std 5	6,6

b. Para mezclar las reacciones, pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape los tubos.

c. Centrifugue brevemente los tubos para quitar las burbujas de aire.

d. Añada 20 µL de la reacción estándar a los pocillos apropiados de la placa de reacción.

Notas

3. Por cada grupo de réplicas, prepare las reacciones para los elementos desconocidos o muestras:

   a. A tubos del tamaño adecuado, añada los volúmenes de la mezcla de reacción y de las muestras que se indican a continuación.

Tubo	Reacción desconocida	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (µL)	Muestra	Volumen de muestra (µL)
1	c-myc en hígado	Mezcla de reacción para c-myc	59,4	Hígado	6,6
2	c-myc en riñón	Mezcla de reacción para c-myc	59,4	Riñón	6,6
3	GAPDH en hígado	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	Hígado	6,6
4	GAPDH en riñón	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	Riñón	6,6

   b. Para mezclar las reacciones, pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape los tubos.

   c. Centrifugue brevemente los tubos para quitar las burbujas de aire.

   d. Añada 20 µL de la mezcla de reacción desconocida (muestra) a los pocillos apropiados de la placa de reacción.

4. Selle la placa de reacción con película adhesiva óptica.

5. Centrifugue brevemente la placa de reacción para quitar las burbujas de aire.

6. Hasta que esté preparado para realizar la reacción, coloque la placa de reacción en hielo en un sitio oscuro.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de curva estándar relativa:

- Procure utilizar los consumibles adecuados.
- Asegúrese de que la colocación de las reacciones de PCR se corresponde con la disposición de la placa que se muestra en el software StepOne. Puede:
  - Aceptar la disposición de la placa que genera automáticamente el software.

    o

  - Utilizar el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) para cambiar la disposición de la placa en el software.

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La preparación de la placa de reacción, consulte el protocolo apropiado para los reactivos que está utilizando en las reacciones de PCR:
  - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- Los consumibles, consulte "Consumibles admitidos" en la página 3.
- El uso del flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) para cambiar la disposición de la placa, consulte "Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)" en la página 206.

Notas

Notas

4 Realización del experimento de curva estándar relativa

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Resumen del capítulo 68
- Preparación de la reacción 69
- (Opcional) Activación de las notificaciones 71
- Inicio de la reacción 73
- Monitorización de la reacción 76
- Descarga de la placa de reacción y transferencia de datos 87

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

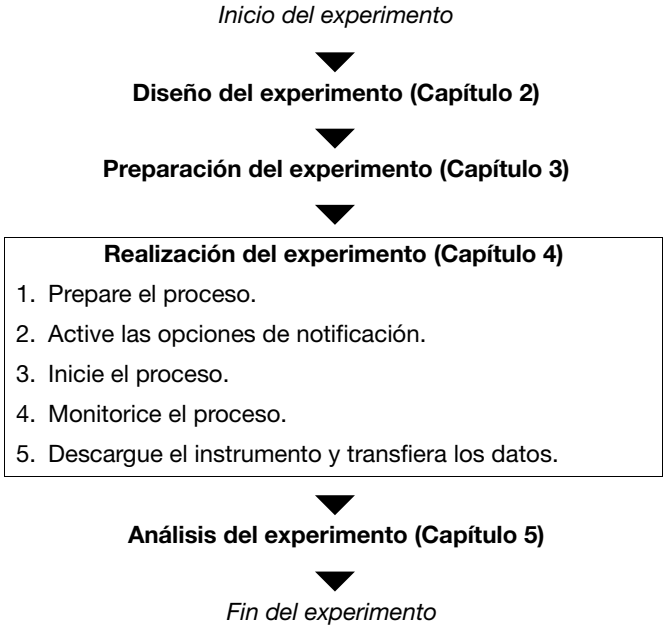
Notas

Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo realizar una reacción en Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para realizar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.


Inicio del experimento
Diseño del experimento (Capítulo 2)
Preparación del experimento (Capítulo 3)
Realización del experimento (Capítulo 4)
1. Prepare el proceso.
2. Active las opciones de notificación.
3. Inicie el proceso.
4. Monitorice el proceso.
5. Descargue el instrumento y transfiera los datos.
Análisis del experimento (Capítulo 5)
Fin del experimento

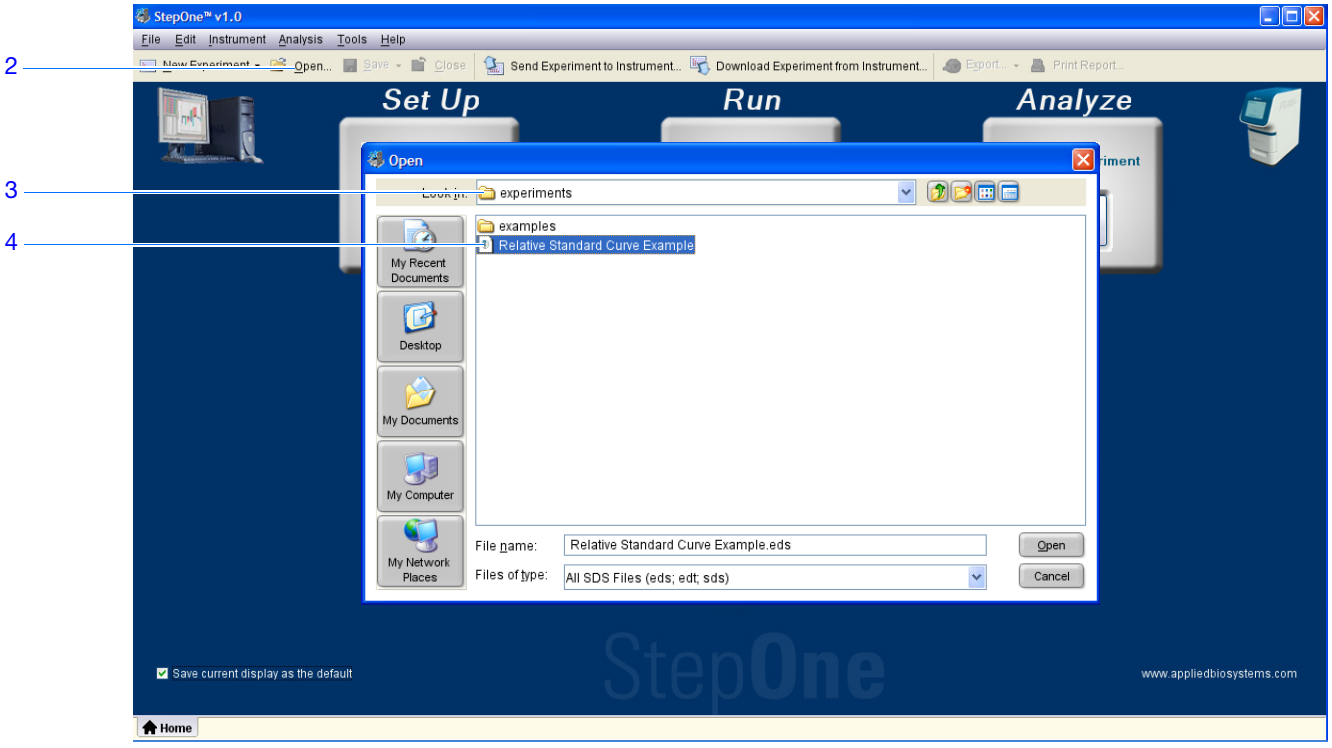
Notas

Preparación de la reacción

Para preparar la reacción, abra el experimento y cargue la MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate en el instrumento StepOne™.

Apertura del experimento de ejemplo

1. Si aún no se está ejecutando el software StepOne™, haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Open** (Abrir).
3. En el cuadro de diálogo Open (Abrir), desplácese hasta la carpeta **experiments** (experimentos) (predeterminada).
4. Haga doble clic en **Relative Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar relativa) para abrir el archivo del experimento de ejemplo que ha creado en el Capítulo 2.



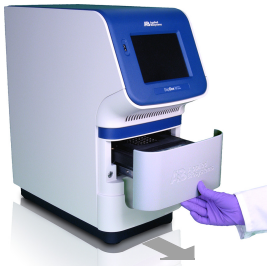
Notas

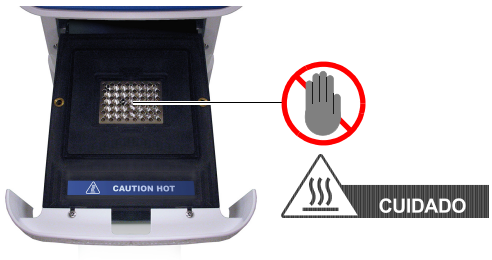
Carga de la placa de reacción

CUIDADO **PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS.** Durante el uso del instrumento, la temperatura del bloque puede superar los 100 °C. Si el instrumento se ha utilizado recientemente, mantenga las manos alejadas de él hasta que el bloque alcance la temperatura ambiente.

¡IMPORTANTE! Lleve guantes sin polvo para manejar la placa de reacción.

1. Abra la bandeja del instrumento.

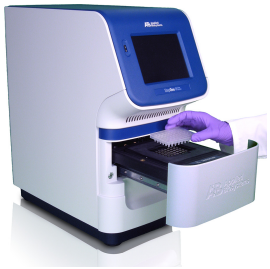




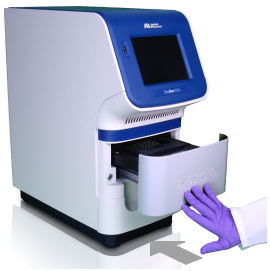
2. Coloque las reacciones en el bloque.

   La colocación de las reacciones depende del tipo de consumible que se utilice:

   - Si utiliza una placa de reacción, colóquela con el pocillo A1 en la esquina posterior izquierda.
   - Si utiliza tiras de tubos de reacción, colóquelas en el bloque directamente.



3. Cierre cuidadosamente la bandeja del instrumento.



Notas

(Opcional) Activación de las notificaciones

Active las opciones de notificación para que el software StepOne le avise por correo electrónico del momento en que el instrumento StepOne comienza y completa el proceso, o si se produce algún error en el proceso. La activación de la función de notificación es opcional y no afecta al rendimiento del sistema StepOne™ ni a la duración de la reacción.

¡IMPORTANTE! La función de notificación sólo está disponible si el ordenador donde desea recibir la notificación está controlando el instrumento StepOne *y* está conectado a una red Ethernet.

Nota: El sistema de notificación también está disponible en los ordenadores que monitorizan un instrumento StepOne de manera remota. Para obtener más información acerca de la monitorización remota, consulte "Monitorización remota" en la página 83.

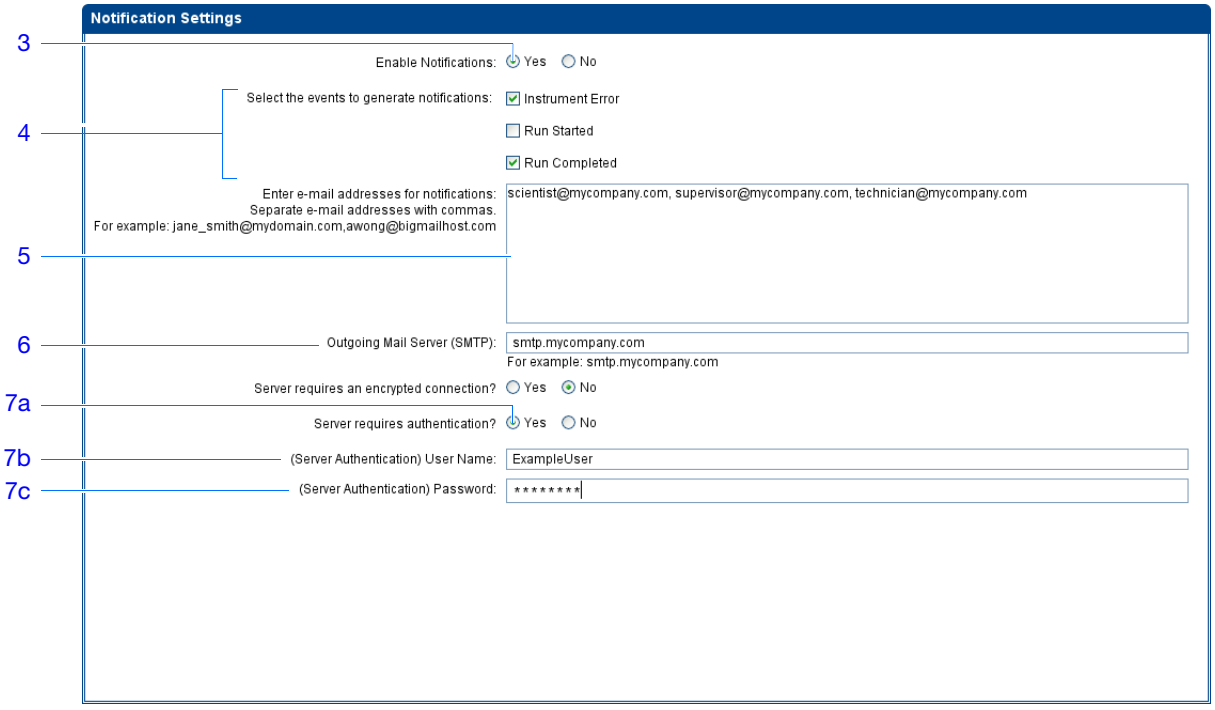
Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de ejemplo, el software StepOne está configurado para enviar notificaciones a tres usuarios (científico, supervisor y técnico de mycompany.com) cuando el sistema StepOne termina el proceso y si encuentra algún error durante la operación. El servidor SMTP de ejemplo (www.mycompany.com) está configurado para el cifrado SSL (Secure Sockets Layer) y, para utilizarlo, se requiere autenticación.

Configuración de las opciones de notificación

1. En el software StepOne, haga clic en **Run** (Proceso) en la columna de navegación.
2. Haga clic en **Notification Settings** (Opciones de notificación).
3. Seleccione **Enable Notifications** (Activar notificaciones).
4. Seleccione los eventos que desencadenarán las notificaciones:
   a. Seleccione **Instrument Error** (Error del instrumento).
   b. Seleccione **Run Completed** (Proceso completado).
5. En el campo Enter e-mail addresses for notifications (Escriba las direcciones de correo electrónico para las notificaciones), escriba: **scientist@mycompany.com, supervisor@mycompany.com, technician@mycompany.com**.
6. En el campo Outgoing Mail Server (SMTP) (Servidor de correo saliente (SMTP)), escriba **smtp.mycompany.com**.
7. Ajuste las opciones de autenticación:
   a. Seleccione **No** en Server requires authentication (El servidor requiere autenticación).
   b. En el campo User Name (Nombre de usuario), escriba **supervisor**.
   c. En el campo Password (Contraseña), escriba **password**.

Notas



Directrices de proceso

Si configura el sistema StepOne para la notificación automática:

- El sistema StepOne debe estar configurado para su uso en red. Consulte la *Guía de instalación de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.
- Determine los eventos de los que quiere recibir una notificación:
  - **Instrument Error** (Error del instrumento): el sistema StepOne envía por correo electrónico a los destinatarios todos los errores que se producen en el instrumento StepOne durante cada proceso.
  - **Run Started** (Proceso iniciado): el proceso StepOne envía un correo electrónico a los destinatarios cada vez que el instrumento inicia una reacción.
  - **Run Completed** (Proceso completado): el proceso StepOne envía un correo electrónico a los destinatarios cada vez que el instrumento completa una reacción.
- Obtenga las direcciones de correo electrónico en las que desea recibir notificaciones.

  ¡IMPORTANTE! Separe las direcciones con una coma (,).

- Póngase en contacto con el administrador del sistema o con el departamento de tecnología de la información para obtener:
  - La dirección de red del servidor de protocolo de transferencia de correo simple (SMTP) en la LAN
  - Un nombre de usuario y contraseña para el servidor, si son necesarios para el acceso
  - La configuración de SSL (Secure Sockets Layer) del servidor (activada o desactivada)

Notas

Inicio de la reacción

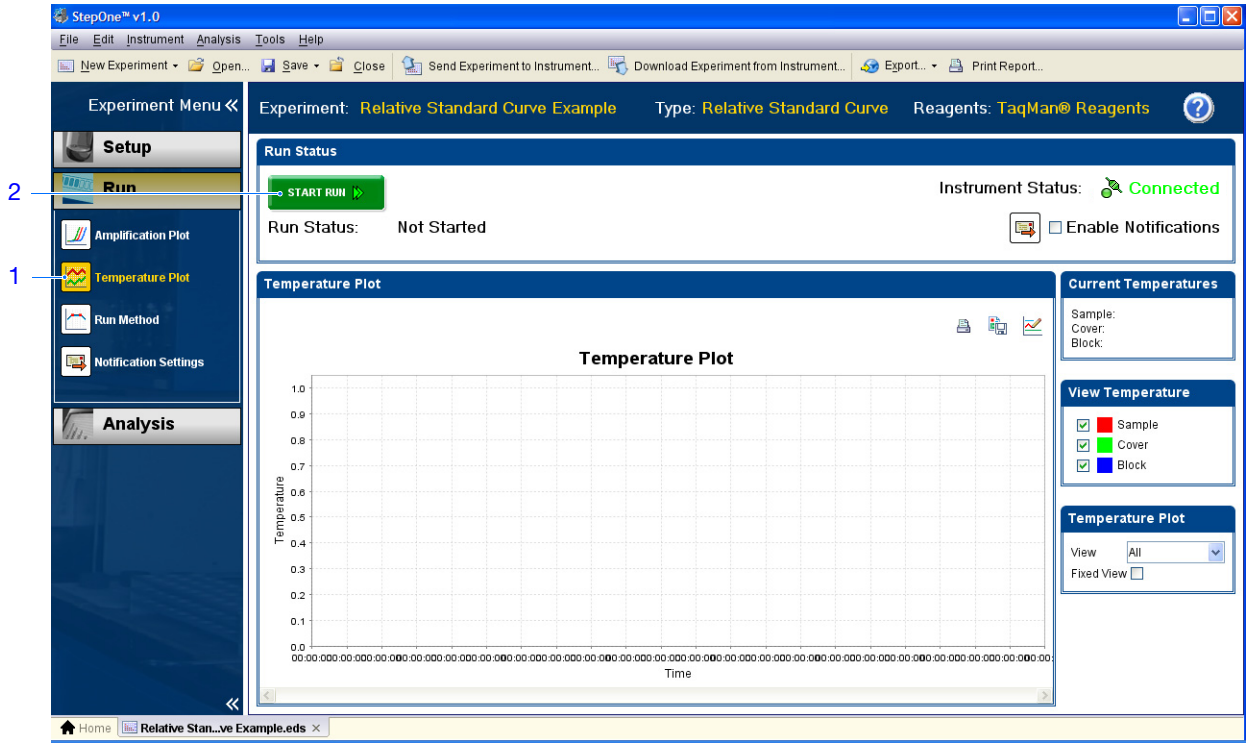
Inicie el proceso de acuerdo con la disposición del instrumento StepOne. La forma en la que hay que iniciar el proceso depende de la disposición del sistema StepOne:

Disposición	Descripción	Consulte…
Conectada	El cable amarillo del sistema StepOne conecta el ordenador al instrumento StepOne.	"Inicio conectado" más abajo
Autónoma	• El ordenador y el instrumento StepOne no están conectados, o • El ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red.	"Inicio autónomo" en la página 74

Inicio conectado

Realice este procedimiento si el ordenador está conectado directamente al instrumento StepOne por medio del cable del sistema StepOne.

1. En el software StepOne, haga clic en **Temperature Plot** (Gráfica de temperatura).
2. Haga clic en **START RUN** (Iniciar proceso) .

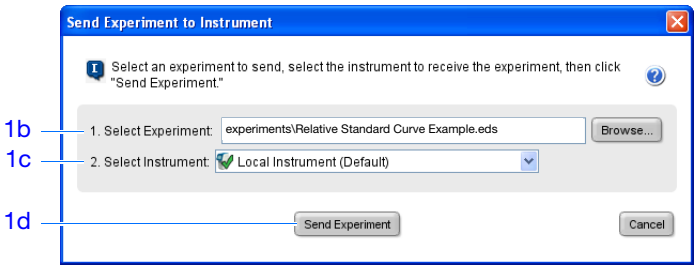


Notas

Inicio autónomo

Realice este procedimiento si el ordenador y el instrumento StepOne *no están* directamente conectados por medio del cable amarillo del sistema StepOne.

1. Si el ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red, realice los pasos 1a a 1f. De lo contrario, vaya al paso 2.
   a. En el software StepOne, haga clic en **Send Experiment to Instrument** (Enviar experimento al instrumento).
   b. En el cuadro de diálogo Send Experiment to Instrument (Enviar experimento al instrumento), haga clic en **Browse** (Examinar), seleccione el archivo **Relative Standard Curve Example.eds** y, a continuación, haga clic en **Open** (Abrir).
   c. Seleccione el instrumento StepOne en el menú desplegable Select Instrument (Seleccionar instrumento).
      Si no aparece su instrumento StepOne, configúrelo para la monitorización, tal y como se explica en la *Guía de instalación de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.
   d. Haga clic en **Send Experiment** (Enviar experimento) para enviar el experimento al instrumento StepOne a través de la red.

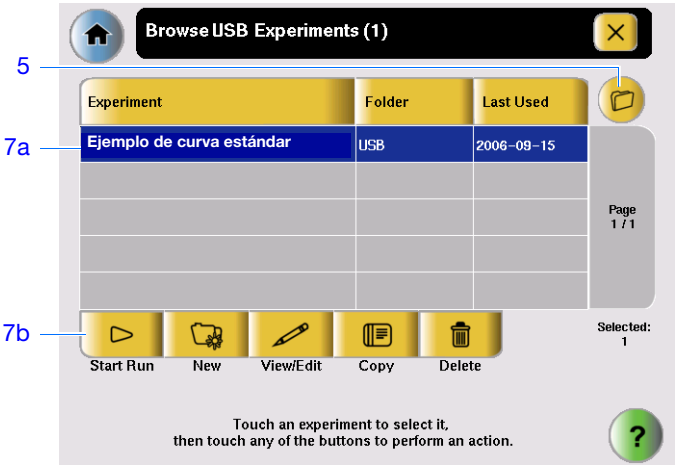


   e. Cuando se le solicite, haga clic en **OK** (Aceptar) para cerrar el mensaje de confirmación.
   f. Vaya al paso 6.

2. Si el instrumento StepOne no está conectado al ordenador, realice los pasos 2a a 2d para transferir el experimento utilizando una unidad USB.
   a. Conecte la unidad USB a uno de los puertos USB del ordenador.
   b. En el software StepOne, seleccione **Save** (Guardar) ▸ **Save As** (Guardar como).
   c. En el cuadro de diálogo Save (Guardar), desplácese a la unidad USB y, a continuación, haga clic en **Save** (Guardar).
   d. Extraiga la unidad USB del ordenador y, a continuación, conéctela al puerto USB del instrumento StepOne.

Notas

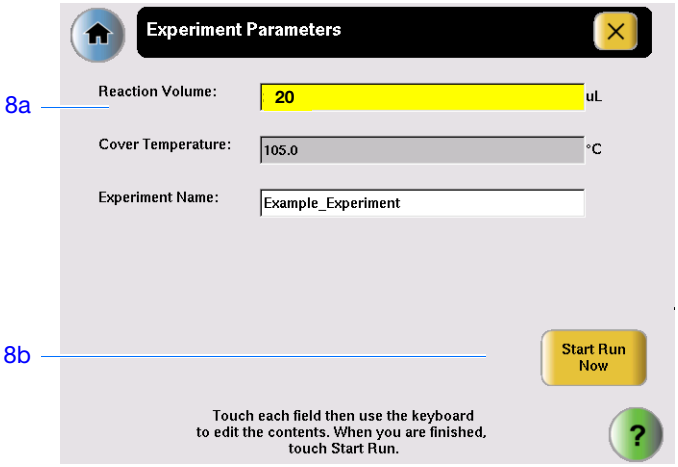
3. Toque la pantalla táctil del instrumento StepOne y, a continuación, toque .
4. En la pantalla del menú principal, toque **Browse Experiments** (Buscar experimentos).
5. En la pantalla Browse Methods (Métodos de búsqueda), toque (Folders) (Carpetas).
6. En la pantalla Choose an Experiment Category (Elija una categoría de experimento):
   - Toque **USB** si ha transferido el experimento a una unidad USB.
   - Toque **Default** (Predeterminado) si ha enviado el experimento a través de una conexión de red.
7. En la pantalla Browse USB/Default Experiments (Buscar USB/experimentos predeterminados):
   a. Toque **Relative Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar relativa) para seleccionar el experimento.
   b. Toque **Start Run** (Iniciar proceso).



8. En la pantalla Run Parameters (Parámetros de proceso):
   a. Toque el campo **Reaction Volume** (Volumen de reacción), utilice el teclado para escribir **20** µL y, a continuación, toque **Done** (Finalizado).

Notas

b. Toque **Start Run** (Iniciar proceso).



Monitorización de la reacción

Monitorice el progreso desde un ordenador que ejecute el software StepOne o desde la pantalla táctil del instrumento StepOne. La forma en la que monitorice el proceso depende de la disposición del sistema StepOne:

Disposición	Descripción	Consulte…
Conectada	El cable del sistema StepOne conecta el ordenador al instrumento StepOne.	"Monitorización conectada" más abajo
Autónoma (en red)	El ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red.	"Monitorización remota" en la página 83
Autónoma (básica)	El ordenador y el instrumento StepOne no están conectados.	"Monitorización autónoma" en la página 86

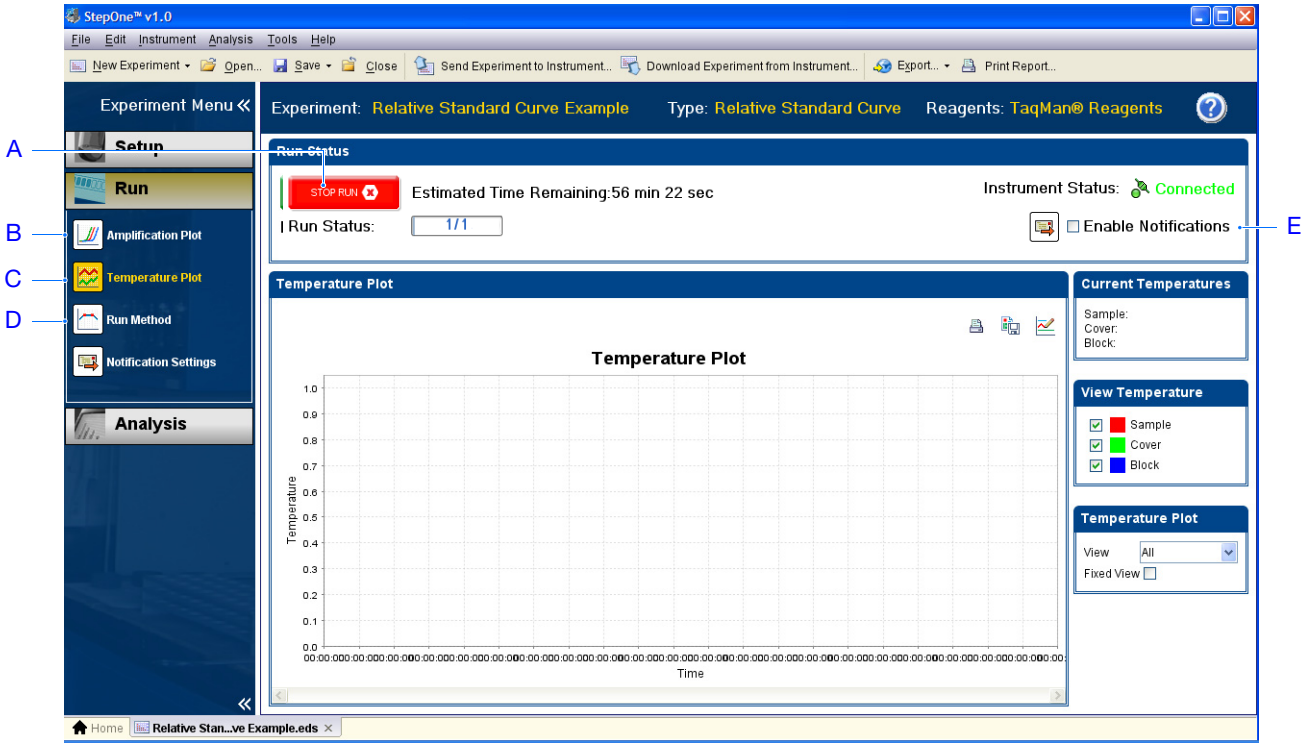
Notas

Monitorización conectada

Si el ordenador está directamente conectado al instrumento StepOne por medio del cable del sistema StepOne, puede ver el progreso de la reacción a tiempo real de la forma que se describe a continuación. Durante el proceso, observe periódicamente las tres gráficas disponibles en el software StepOne para detectar posibles problemas.

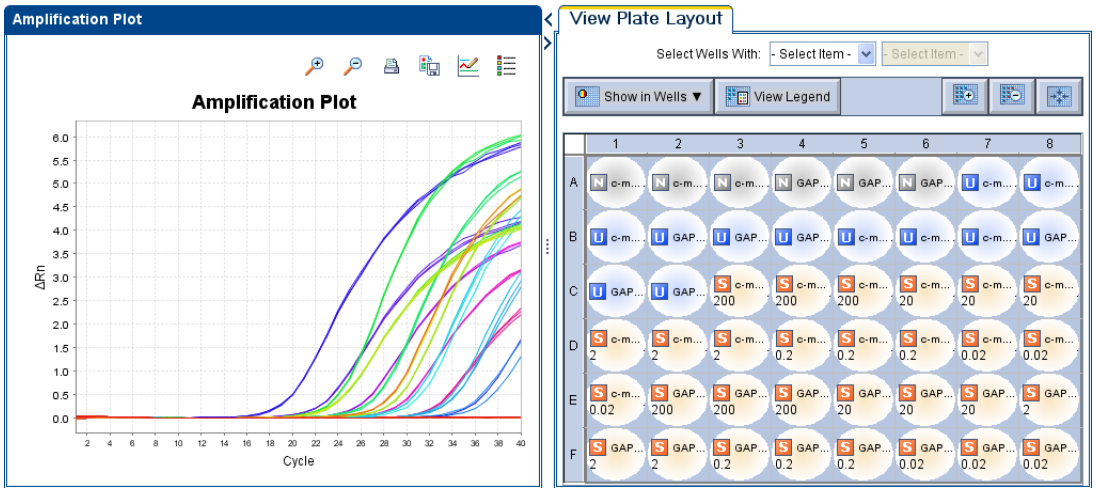
#	Para...	Acción
A	Detener el proceso	1. En el software StepOne, haga clic en **STOP RUN** (Detener proceso). 2. En el cuadro de diálogo Stop Run (Detener proceso), haga clic en una de las siguientes opciones: – **Stop Immediately** (Detener inmediatamente) para detener el proceso inmediatamente. – **Stop after Current Cycle/Hold** (Detener después de ciclo actual/espera) para detener el proceso después del ciclo o la espera actual. – **Cancel** (Cancelar) para continuar el proceso.
B	Ver los datos de amplificación a tiempo real	Seleccione **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación). Consulte "Acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación)" en la página 78.
C	Ver los datos de la temperatura de la reacción a tiempo real	Seleccione **Temperature Plot** (Gráfica de temperatura). Consulte "Acerca de la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura)" en la página 80.
D	Ver el progreso de la reacción en la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado)	Seleccione **Run Method** (Protocolo de termociclado). Consulte "Acerca de la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado)" en la página 81.
E	Activar/desactivar las opciones de notificación	Active o desactive la opción **Enable Notifications** (Activar notificaciones).

Notas



Acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación)

La pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) permite ver la amplificación de las muestras a medida que el instrumento StepOne recoge datos de fluorescencia durante una reacción. Si se configura un protocolo de recogida de datos a tiempo real, en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) aparecen los datos de los pocillos seleccionados en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa). La gráfica representa la fluorescencia de los distintos fluorocromos normalizados (ΔR_n) y el número de ciclos. La siguiente figura muestra la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) durante el experimento de ejemplo.



Notas

La pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) es útil para identificar y examinar amplificaciones anormales. Una amplificación anormal puede incluir lo siguiente:

- Aumento de la fluorescencia en los pocillos de control negativo.
- Ausencia de fluorescencia detectable en el ciclo esperable (determinada a partir de experimentos similares anteriores utilizando los mismos reactivos en las mismas condiciones).

Si se observa una amplificación anormal o una completa ausencia de señal, solucione el error de la forma que se explica en la ayuda del software StepOne (haga clic en en la barra de herramientas o seleccione **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne)).

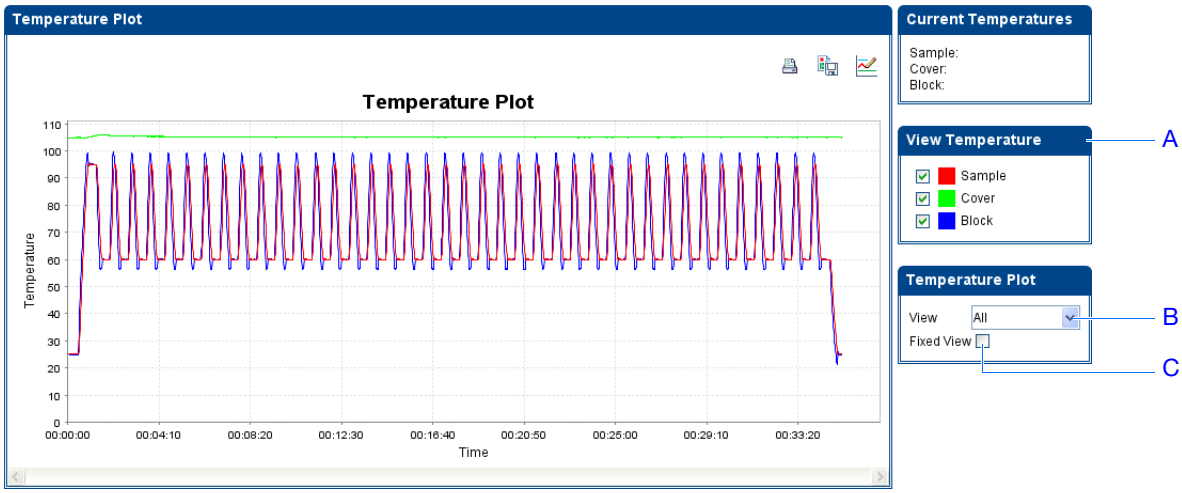
Nota: Para ver los datos de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), seleccione los pocillos que desea ver en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa).

Notas

Acerca de la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura)

Durante una reacción, la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) muestra las temperaturas del bloque, la cubierta caliente y las muestras (calculadas) a tiempo real. La siguiente figura muestra la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) durante el experimento de ejemplo.

	Para...	Acción
A	Añadir/quitar gráficas de temperatura	Seleccione **Sample** (Muestra), **Heated Cover** (Cubierta caliente) o **Sample Block** (bloque) para cambiar la presencia de los datos asociados en la gráfica.
B	Cambiar el tiempo que se muestra por gráfica	Seleccione **View** (Ver) ▸ (duración).
C	Restringir el eje Y de la gráfica	Seleccione **Fixed View** (Vista fija).



La pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) puede ser útil para identificar averías del hardware. Al monitorizar la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura), observe las gráficas Sample (Muestra), Heated Cover (Cubierta caliente) y Sample Block (Bloque) para detectar algún comportamiento anormal.

- En general, las gráficas Sample (Muestra) y Block (Bloque) deberían ser más o menos un espejo la una de la otra. Una desviación significativa de las gráficas puede indicar un problema.
- La gráfica Heated Cover (Cubierta caliente) debería mantener la temperatura constante que se especifica en el protocolo de termociclado. Cualquier desviación de la temperatura puede indicar un problema.

Notas

Si observa una gráfica de temperatura anormal, solucione el error de la forma que se explica en la ayuda del software StepOne (haga clic en en la barra de herramientas o seleccione **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne)).

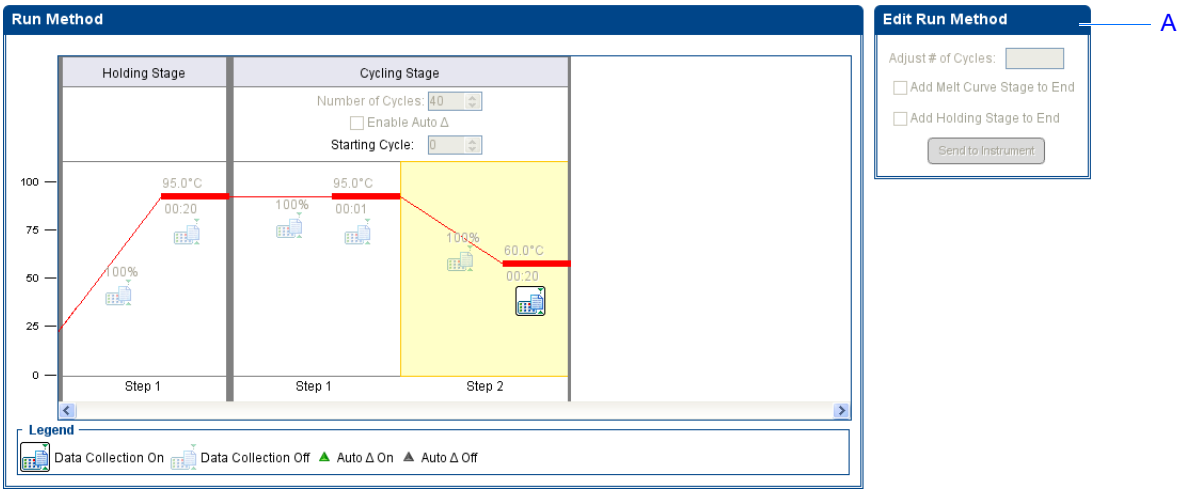
Nota: La temperatura de las muestras que se indica en el grupo Current Temperatures (Temperaturas actuales) es un valor estimado.

Acerca de la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado)

Después de comenzar el proceso, el sistema StepOne muestra su progreso en la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado). La vista informa del progreso de la reacción en referencia con el perfil térmico de la misma. La siguiente figura muestra la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado) durante el experimento de ejemplo.

	Para...	Acción
A	Cambiar el protocolo de termociclado (añadir ciclos, una espera o una curva de disociación)	1. En el panel de navegación, haga clic en **Run Method** (Protocolo de termociclado). 2. En la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado), haga cualquiera de las siguientes acciones: – Escriba el número de ciclos que se van a aplicar a la fase cíclica. – Seleccione **Add Melt Curve Stage to End** (Añadir curva de disociación al final) si desea añadir una curva de disociación al final de la reacción. – Seleccione **Add Holding Stage to End** (Añadir fase de espera al final) si desea añadir una fase de espera al final de la reacción. 3. Haga clic en **Send to Instrument** (Enviar al instrumento).

Notas



Nota: Si aparece una alerta, haga clic en el error para obtener más información y solucionar el problema tal y como se explica en la ayuda del software StepOne (haga clic en en la barra de herramientas o seleccione **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne)).

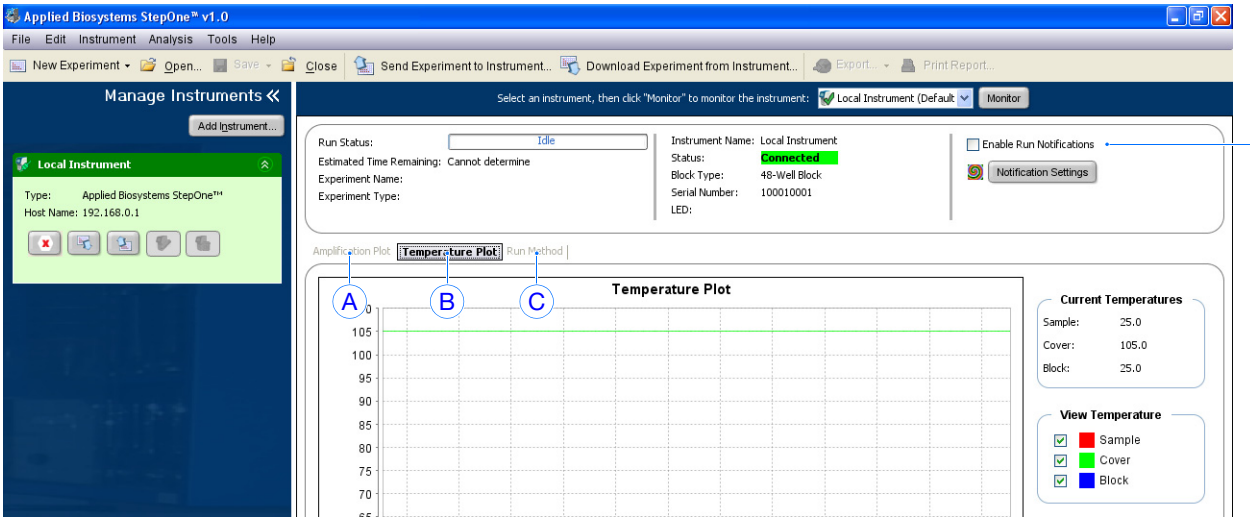
Notas

Monitorización remota

Si el instrumento StepOne está conectado a una red, puede utilizar la función de monitorización remota del software StepOne para ver el progreso de la reacción a tiempo real desde cualquier ordenador de la red.

¡IMPORTANTE! Los ordenadores en red no pueden controlar el instrumento StepOne, sólo monitorizarlo.

#	Para...	Acción
A	Ver los datos de amplificación a tiempo real	Haga clic en **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación). Consulte "Acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación)" en la página 78.
B	Ver los datos de la temperatura de la reacción a tiempo real	Haga clic en **Temperature Plot** (Gráfica de temperatura). Consulte "Acerca de la pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura)" en la página 80.
C	Ver el progreso de la reacción en la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado)	Haga clic en **Run Method** (Protocolo de termociclado). Consulte "Acerca de la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado)" en la página 81.
D	Activar/desactivar las opciones de notificación	Active o desactive la opción **Enable Notifications** (Activar notificaciones). Consulte "(Opcional) Activación de las notificaciones" en la página 71.



Para monitorizar el instrumento StepOne de manera remota:

1. En el software StepOne, seleccione **Instrument** (Instrumento) ▸ **Remote Monitor** (Supervisor remoto).
2. En la barra de navegación, seleccione el instrumento StepOne.

   Si en la barra de navegación no aparece el instrumento StepOne:

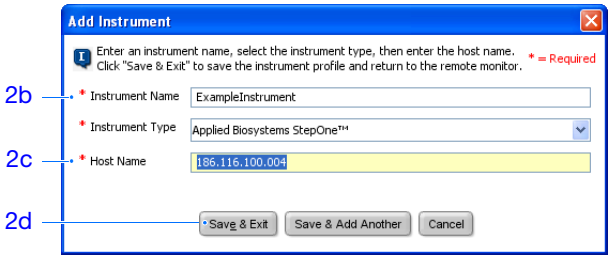
Notas

a. Haga clic en **Add Instrument** (Añadir instrumento).

b. Haga clic en el campo **Instrument Name** (Nombre de instrumento) y, a continuación, escriba el nombre del instrumento.

c. Haga clic en el campo **Host Name** (Nombre de host) y, a continuación, introduzca la dirección IP del instrumento.

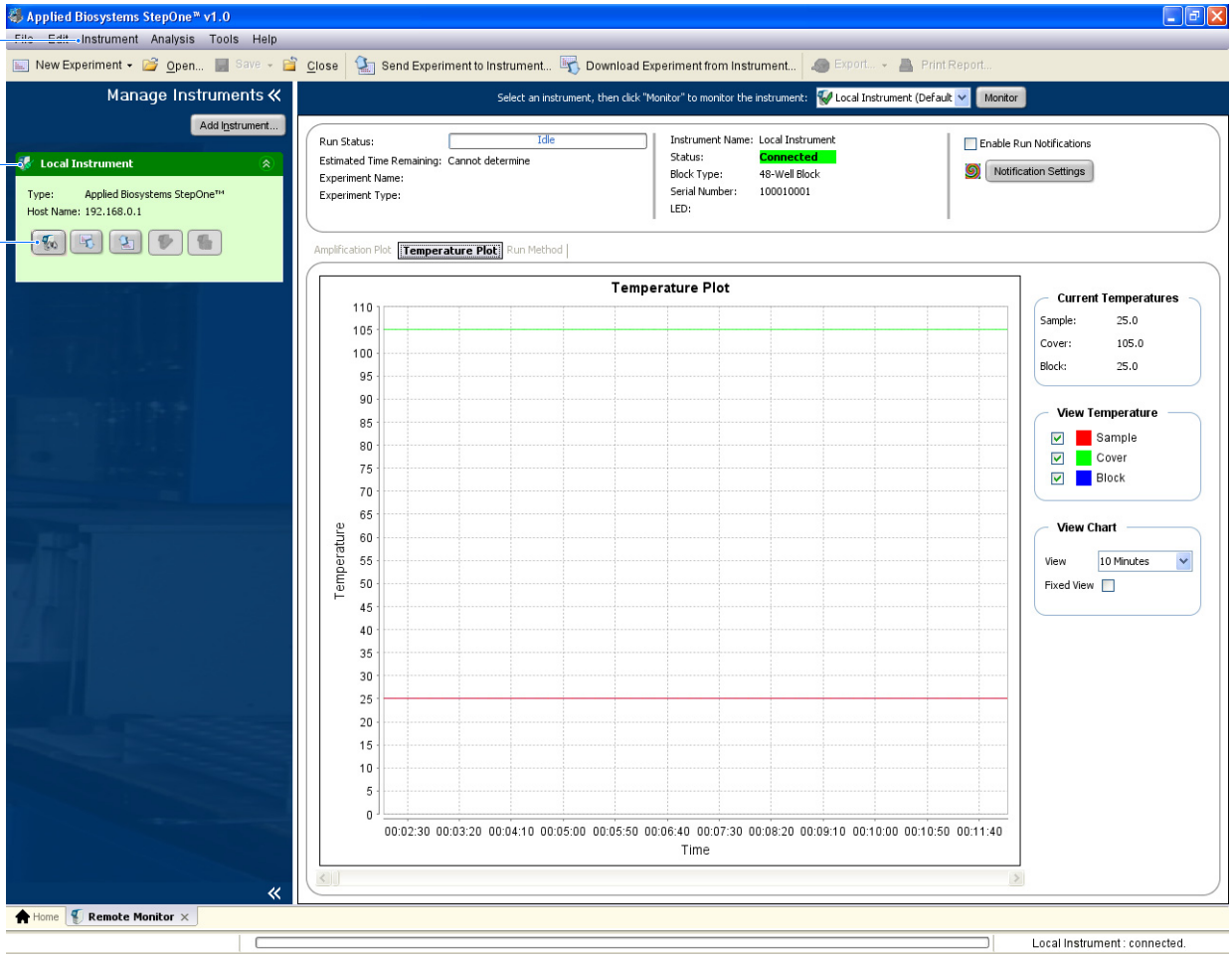
d. Haga clic en **Save & Exit** (Guardar y salir).



Nota: Para obtener más información acerca de la configuración del instrumento StepOne para el uso en red o la monitorización remota, consulte la *Guía de instalación de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

3. Haga clic en (Start monitoring this instrument) (Comenzar a monitorizar este instrumento) de su instrumento.

Notas

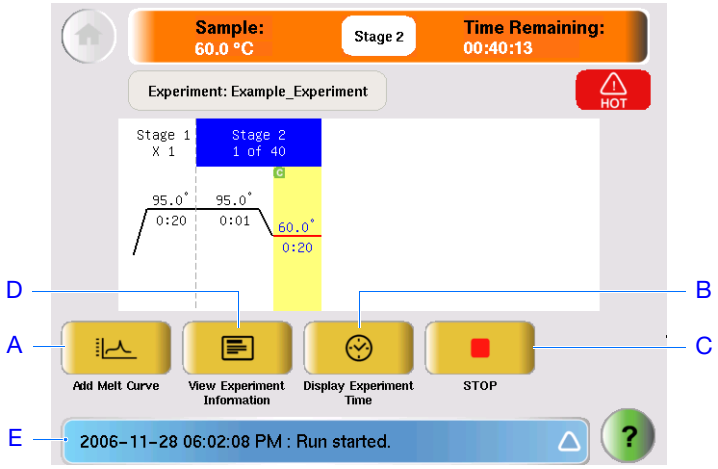

1
2
3
Applied Biosystems StepOne™ v1.0
File Edit Instrument Analysis Tools Help
New Experiment
Open...
Save
Close
Send Experiment to Instrument...
Download Experiment from Instrument...
Export...
Print Report...
Manage Instruments
Add Instrument...
Local Instrument
Type: Applied Biosystems StepOne™
Host Name: 192.168.0.1
Select an instrument, then click "Monitor" to monitor the instrument:
Local Instrument (Default
Monitor
Run Status: Idle
Estimated Time Remaining: Cannot determine
Experiment Name:
Experiment Type:
Instrument Name: Local Instrument
Status: Connected
Block Type: 48-Well Block
Serial Number: 100010001
LED:
Enable Run Notifications
Notification Settings
Amplification Plot
Temperature Plot
Run Method
Temperature Plot
Temperature
Time
Current Temperatures
Sample: 25.0
Cover: 105.0
Block: 25.0
View Temperature
Sample
Cover
Block
View Chart
View
10 Minutes
Fixed View
Home
Remote Monitor
Local Instrument : connected.

Notas

Monitorización autónoma

Si ha comenzado la reacción desde el instrumento StepOne, puede ver el progreso de la misma desde la pantalla táctil. La pantalla Run Method (Protocolo de termociclado) muestra el método del experimento y resalta los pasos del perfil térmico a medida que el instrumento va realizándolos.

#	Para...	Acción
A	Añadir una curva de disociación a la reacción	Toque (Add Dissociation Curve) (Añadir curva de disociación) y, a continuación, toque **OK** (Aceptar).
B	Ver el tiempo que queda en el proceso	Toque **Display Method Time** (Ver tiempo de método) y, a continuación, toque para regresar a la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado).
C	Detener el proceso	Toque **Stop** (Detener) y, a continuación, toque: • **Stop** (Detener) para detener el proceso después de que el instrumento StepOne complete el ciclo o la espera actual. • **Abort** (Abortar) para detener el proceso inmediatamente. • para continuar el proceso sin ningún cambio.
D	Ver información del experimento	Toque **View Method Information** (Ver información del método) y, a continuación, toque para regresar a la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado).
E	Ver el registro de errores	Toque la barra de estado para ver el registro de errores.



Notas

Descarga de la placa de reacción y transferencia de datos

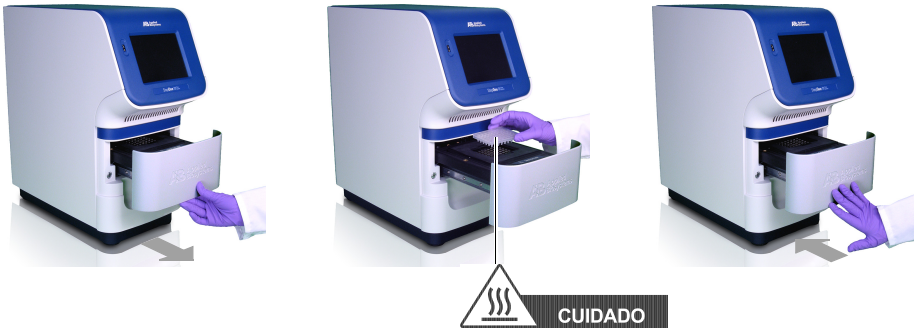
Cuando el instrumento StepOne muestre la pantalla Run History (Historial de la reacción), descargue la placa de reacción del instrumento StepOne y transfiera los datos del experimento al ordenador para analizarlos.

Descarga de la placa de reacción

CUIDADO **PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS.** Durante el uso del instrumento, la temperatura del bloque puede superar los 100 °C. Mantenga las manos alejadas hasta que la bandeja de las muestras alcance la temperatura ambiente.

Nota: Cuando el instrumento StepOne complete una reacción, el sistema guardará los detalles en el historial de reacciones, que permanece en el sistema hasta que el sistema completa otro proceso.

1. Cuando aparezca la pantalla Run Report (Informe de proceso) en la pantalla táctil del instrumento StepOne, toque .
2. Abra la bandeja del instrumento.
3. Saque la placa de reacción del bloque.
4. Cierre con cuidado la bandeja del instrumento.



¡IMPORTANTE! No apague el instrumento StepOne después de una reacción. El instrumento activa automáticamente un modo de hibernación cuando no se está utilizando.

Notas

Selección de un método de transferencia de datos

Transfiera el experimento al ordenador para analizarlo, de acuerdo con la disposición del sistema StepOne:

Disposición	Descripción	Consulte...
Conectada	El cable del sistema StepOne conecta el ordenador al instrumento StepOne.	"Transferencia de datos conectada" más abajo
Autónoma (en red)	El ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red.	"Transferencia de datos remota" en la página 88
Autónoma (básica)	El ordenador y el instrumento StepOne no están conectados.	"Transferencia de datos autónoma" en la página 89

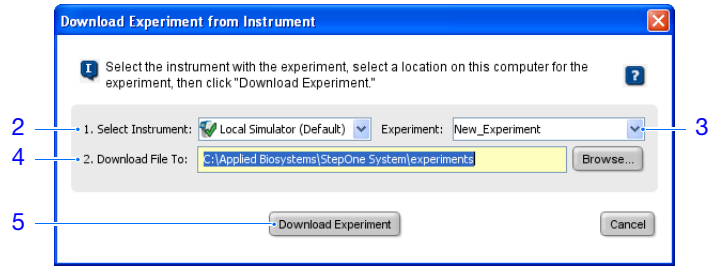
Transferencia de datos conectada

Si el ordenador está conectado directamente al instrumento StepOne por medio del cable del sistema StepOne, no hay que hacer nada. El software StepOne transfiere automáticamente los datos del experimento al instrumento StepOne después de la reacción.

Transferencia de datos remota

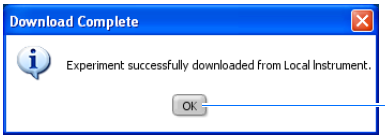
Si el ordenador y el instrumento StepOne están conectados a la misma red Ethernet, envíe el experimento al instrumento StepOne a través de la red:

1. En el software StepOne, haga clic en **Download Experiment from Instrument** (Descargar experimento del instrumento).
2. En el cuadro de diálogo Download Experiment from Instrument (Descargar experimento del instrumento), seleccione **Select Instrument** (Seleccionar instrumento) ▸ *<su instrumento>*.
3. Seleccione **Experiment** (Experimento) ▸ **Relative Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar relativa).
4. En el campo Download File (Descargar archivo), haga clic en **Browse** (Examinar), seleccione una carpeta en la que recibir los datos del experimento y, a continuación, haga clic en **Select** (Seleccionar).
5. Haga clic en **Download Experiment** (Descargar experimento) para descargar el experimento desde el instrumento StepOne al ordenador a través de la red.



6. Cuando se le solicite, haga clic en **OK** (Aceptar) para cerrar el mensaje de confirmación.

Notas



Transferencia de datos autónoma

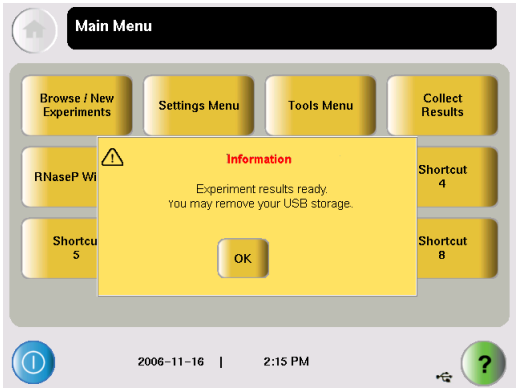
Si el ordenador no está conectado al instrumento StepOne, utilice la unidad USB para transferir el experimento al instrumento:

1. Si aún no está conectada al instrumento, conecte una unidad USB al puerto USB.

2. Toque la pantalla táctil del instrumento StepOne para activarla y, a continuación, toque .
3. En el menú principal, toque **Collect Results** (Recoger resultados) para guardar los datos en la unidad USB.

   Si el instrumento StepOne no encuentra la unidad USB, toque **OK** (Aceptar), espere 30 segundos y, a continuación, vuelva a tocar **Collect Results** (Recoger resultados).

4. Cuando aparezca un mensaje que le informa de que los datos se han transferido correctamente, toque **OK** (Aceptar).



5. Extraiga la unidad USB del instrumento StepOne y, a continuación, conéctela al puerto USB del ordenador.
6. En el escritorio del ordenador, utilice el explorador de Windows para abrir la unidad USB.

Notas

7. Copie el archivo Relative Standard Curve Example.eds en:

   <*unidad*>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments

   donde <*unidad*> es la unidad del disco duro del ordenador en la que está instalado el software de StepOne. La unidad de instalación predeterminada del software es la unidad C.

Notas

5 Análisis del experimento de curva estándar relativa

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Resumen del capítulo 92
- Sección 5.1 Revisión de los resultados 93
- Sección 5.2 Solución de problemas 113

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

Resumen del capítulo

El software StepOne™ analiza los datos mediante el método de cuantificación de curva estándar relativa. En la primera sección de este capítulo, se explica cómo revisar los datos analizados utilizando las pantallas de análisis y cómo presentar los datos. Si los resultados son cuestionables, en la Sección 2 de este capítulo se explican algunos pasos para solucionar los problemas.

Nota: El experimento de curva estándar relativa de ejemplo incluye cuatro pocillos problemáticos que aparecen marcados con un aviso. Los avisos reflejan problemas comunes que se puede encontrar al realizar sus propios experimentos. Se incluyen procedimientos para ver los avisos y omitir uno de los pocillos.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para analizar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.

Experimento de curva estándar relativa

Inicio del experimento

▼

Diseño del experimento (Capítulo 2)

▼

Preparación de las reacciones (Capítulo 3)

▼

Realización del experimento (Capítulo 4)

▼

Análisis del experimento (Capítulo 5)

Sección 1. Revisión de los resultados:

1. Analice.
2. Revise la pantalla Standard Curve (Curva estándar).
3. Revise la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación).
4. Revise la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) o la tabla de pocillos.
5. Presente los datos.

Sección 2. Solución de problemas:

1. Revise las opciones de análisis; ajuste la línea basal y el umbral.
2. Revise la pantalla QC Summary (Resumen QC).
3. Omita pocillos.
4. Revise la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente).
5. Revise la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos).

▼

Fin del experimento

Notas

Sección 5.1 Revisión de los resultados

Esta sección cubre los siguientes temas:

- Análisis del experimento 94
- Visualización de la curva estándar 100
- Revisión de la gráfica de amplificación 103
- Revisión de la gráfica de expresión génica y la tabla de pocillos 108
- Presentación de los datos 111

Notas

Análisis del experimento

El software StepOne analiza el experimento y muestra los resultados en las pantallas de análisis (por ejemplo, en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), QC Summary (Resumen QC), etc.)

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, utilice el archivo de datos que se instala con el software StepOne. Este archivo de datos se ha creado con los mismos parámetros de diseño que se indican en el Capítulo 2 y luego se ha procesado y analizado en un instrumento StepOne™.

Encontrará el archivo de datos del experimento de ejemplo en su ordenador:

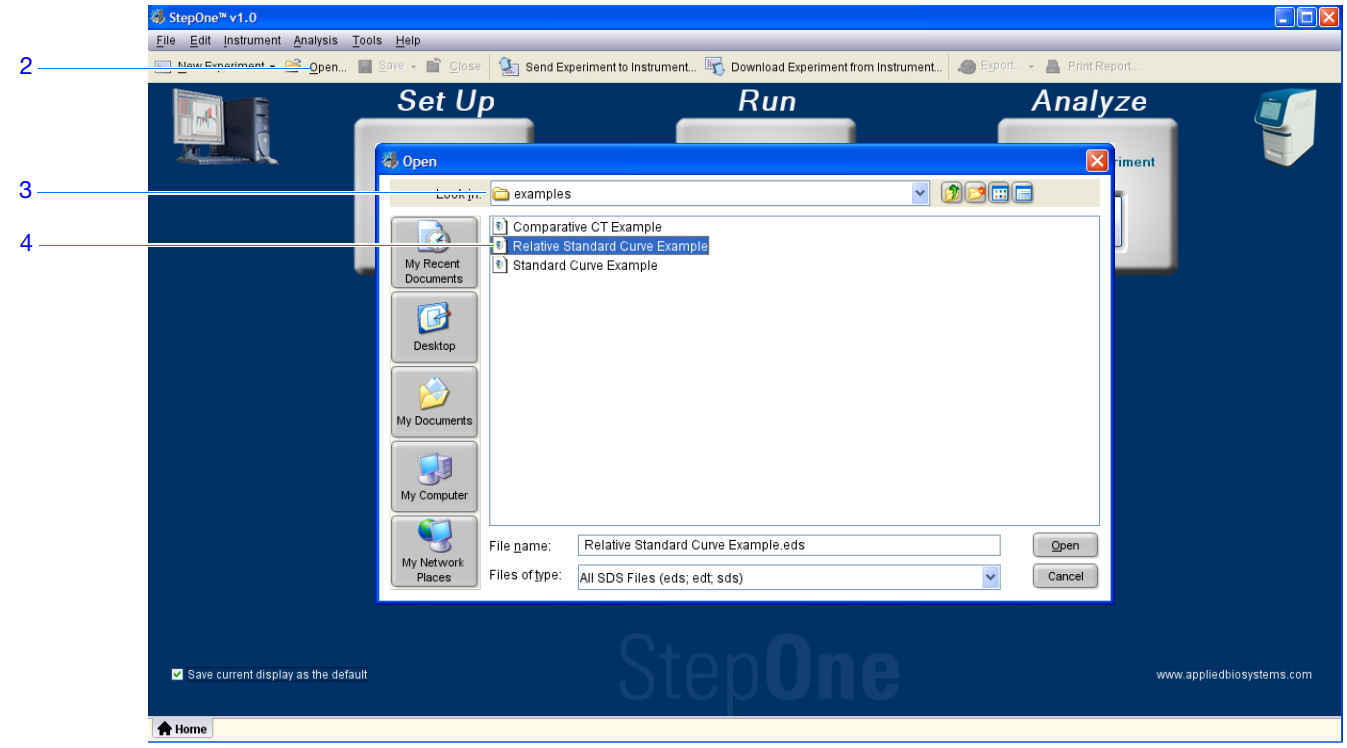
<*unidad*>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

donde <*unidad*> es la unidad del disco duro del ordenador en la que está instalado el software StepOne. La unidad de instalación predeterminada del software es la unidad C.

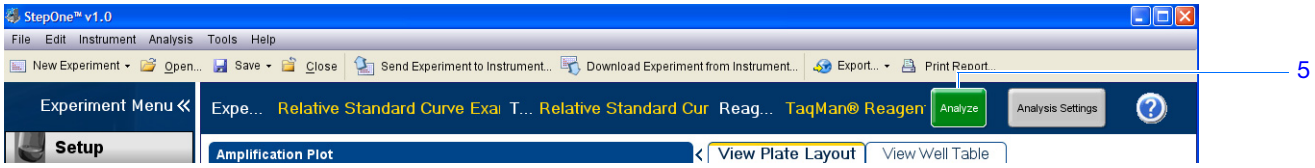
Análisis del experimento de ejemplo

1. Si aún no se está ejecutando el software StepOne, haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Open** (Abrir).
3. En el cuadro de diálogo Open (Abrir), desplácese hasta la carpeta **examples** (ejemplos).
4. Haga doble clic en **Relative Standard Curve Example** (Ejemplo de curva estándar relativa) para abrir el archivo de datos del experimento de ejemplo.

Notas



5. Haga clic en **Analyze** (Analizar). El software analiza los datos utilizando las opciones de análisis predeterminadas.



6. Consulte "Elementos del software" más adelante y "Consejos de desplazamiento" en la página 98 para obtener información acerca de cómo desplazarse por las pantallas de análisis.

Directrices

Cuando analice su propio experimento de curva estándar relativa:

- Inmediatamente después de una reacción, el software StepOne analiza automáticamente los datos utilizando las opciones de análisis predeterminadas y, a continuación, muestra la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) en el ordenador.
- Para volver a analizar los datos, seleccione todos los pocillos de la disposición de la placa y, a continuación, haga clic en **Analyze** (Analizar).

Notas

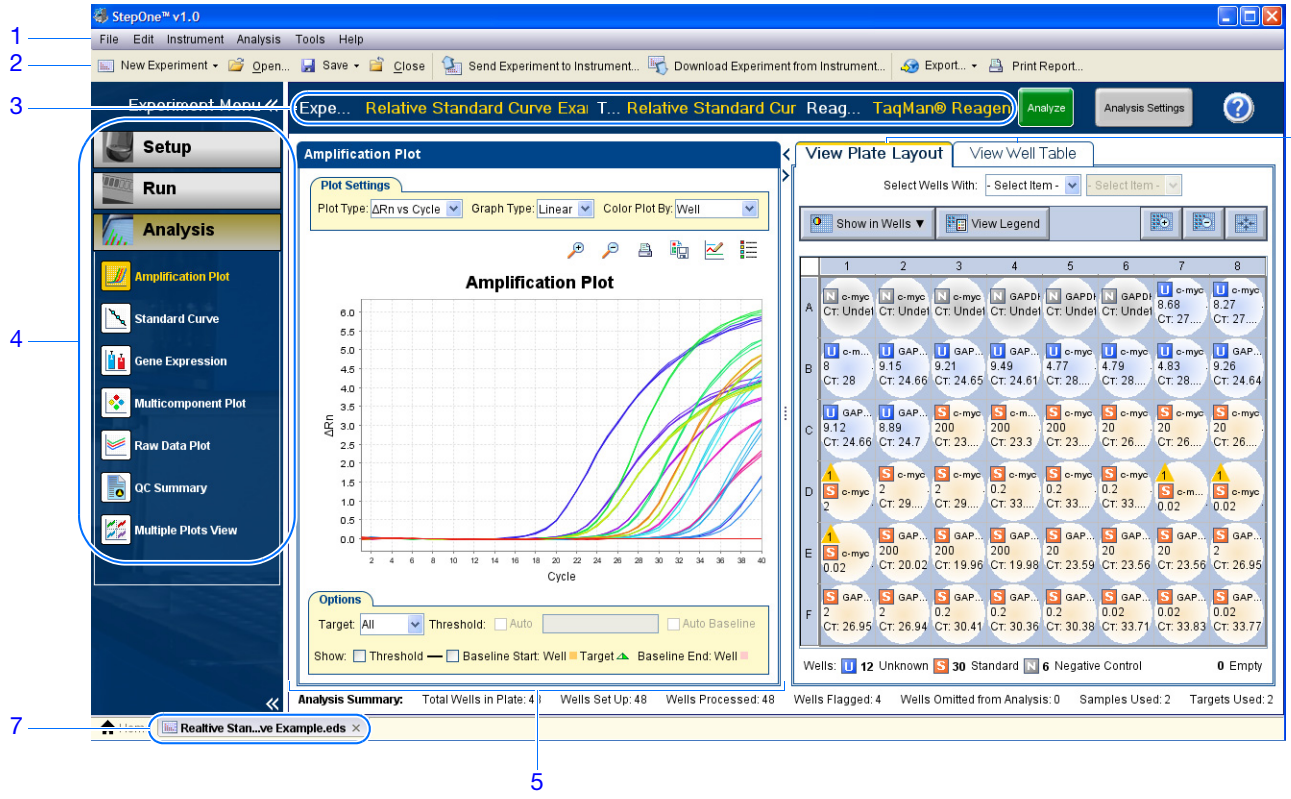
Elementos del software

A continuación, se ilustran los elementos del software StepOne de las pantallas de análisis.

1. Barra de menús: muestra los menús disponibles en el software:
   - File (Archivo)
   - Edit (Edición)
   - Instrument (Instrumento)
   - Analysis (Análisis)
   - Tools (Herramientas)
   - Help (Ayuda)
2. Barra de herramientas: muestra las herramientas disponibles en el software:
   - New Experiment (Experimento nuevo)
   - Open (Abrir)
   - Save (Guardar)
   - Close (Cerrar)
   - Send Experiment to Instrument (Enviar experimento al instrumento)
   - Download Experiment from Instrument (Descargar experimento del instrumento)
   - Export (Exportar)
   - Print Report (Imprimir informe)
3. Cabecera del experimento: indica el nombre del experimento, el tipo de experimento y los reactivos del experimento abierto.
4. Panel de menús del experimento: incluye vínculos a las siguientes pantallas del software:
   - Pantallas de configuración
   - Pantallas del perfil de reacción
   - Pantallas de análisis:
     –Amplification Plot (Gráfica de amplificación)
     –Standard Curve (Curva estándar)
     –Gene Expression (Expresión génica)
     –Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente)
     –Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos)
     –QC Summary (Resumen QC)
     –Multiple Plots View (Vista de múltiples gráficas)
5. Panel de gráficas: muestra la pantalla de análisis seleccionada para el experimento abierto.
6. Fichas de visualización: muestra la disposición de la placa o la tabla de pocillos del experimento abierto.

Notas

7. Fichas del experimento: muestra una ficha por cada experimento abierto.


1
2
3
4
5
6
7
StepOne™ v1.0
File Edit Instrument Analysis Tools Help
New Experiment Open... Save Close Send Experiment to Instrument... Download Experiment from Instrument... Export... Print Report...
Experiment Menu
Setup
Run
Analysis
Amplification Plot
Standard Curve
Gene Expression
Multicomponent Plot
Raw Data Plot
QC Summary
Multiple Plots View
Relative Standard Curve Exa... Relative Standard Cur... TaqMan® Reagen...
Analyze
Analysis Settings
Amplification Plot
Plot Settings
Plot Type: ΔRn vs Cycle Graph Type: Linear Color Plot By: Well
Amplification Plot
ΔRn
Cycle
Options
Target: All Threshold: Auto Auto Baseline
Show: Threshold Baseline Start: Well Target Baseline End: Well
View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With: - Select Item - - Select Item -
Show in Wells
View Legend
Wells: 12 Unknown 30 Standard 6 Negative Control 0 Empty
Analysis Summary: Total Wells in Plate: 4 Wells Set Up: 48 Wells Processed: 48 Wells Flagged: 4 Wells Omitted from Analysis: 0 Samples Used: 2 Targets Used: 2
Realtive Stan...ve Example.eds

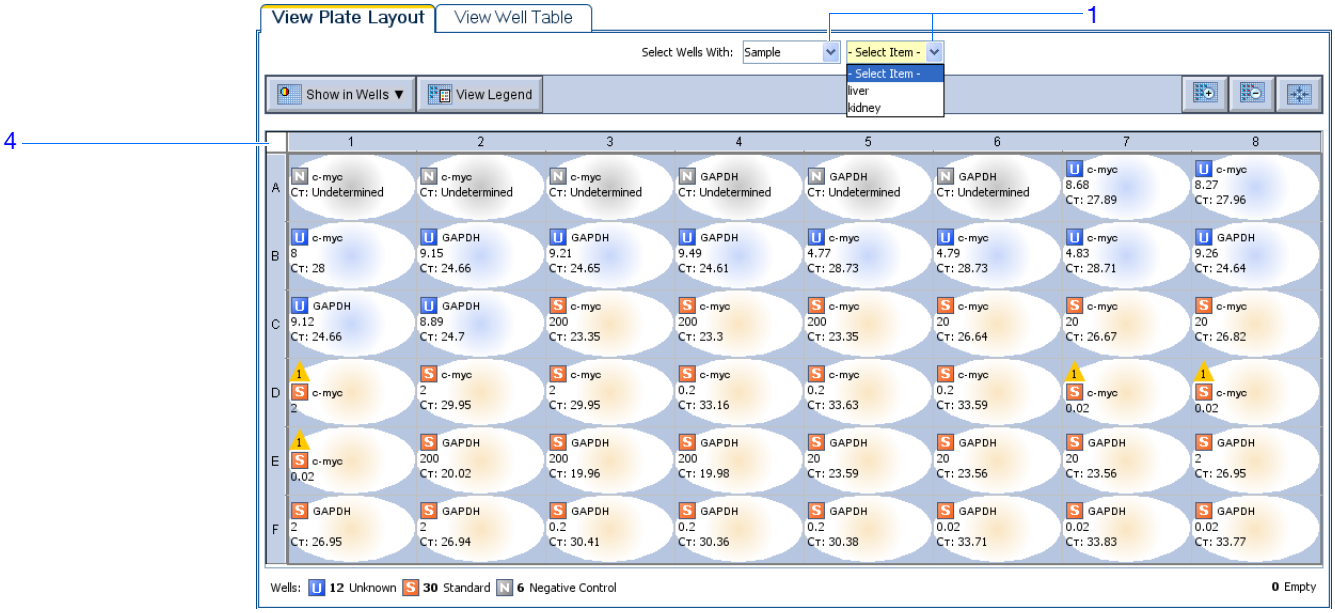
Notas

Consejos de desplazamiento

Cómo seleccionar pocillos

Para ver pocillos específicos en las pantallas de análisis, seleccione los pocillos en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa) de la siguiente manera:

1. Para seleccionar pocillos de un tipo específico, utilice los menús desplegables Select Wells With (Seleccionar pocillos con): seleccione **Sample** (Muestra), **Target** (Diana) o **Task** (Tarea) y, a continuación, seleccione el nombre de la muestra, el gen diana o la tarea.
2. Para seleccionar un solo pocillo, haga clic en él en la disposición de la placa.
3. Para seleccionar varios pocillos, haga clic y arrastre el ratón por encima de los pocillos deseados, pulse **CTRL+clic**, o pulse **Mayús+clic** en la disposición de la placa.
4. Para seleccionar los 48 pocillos, haga clic en la esquina superior izquierda de la disposición de la placa.

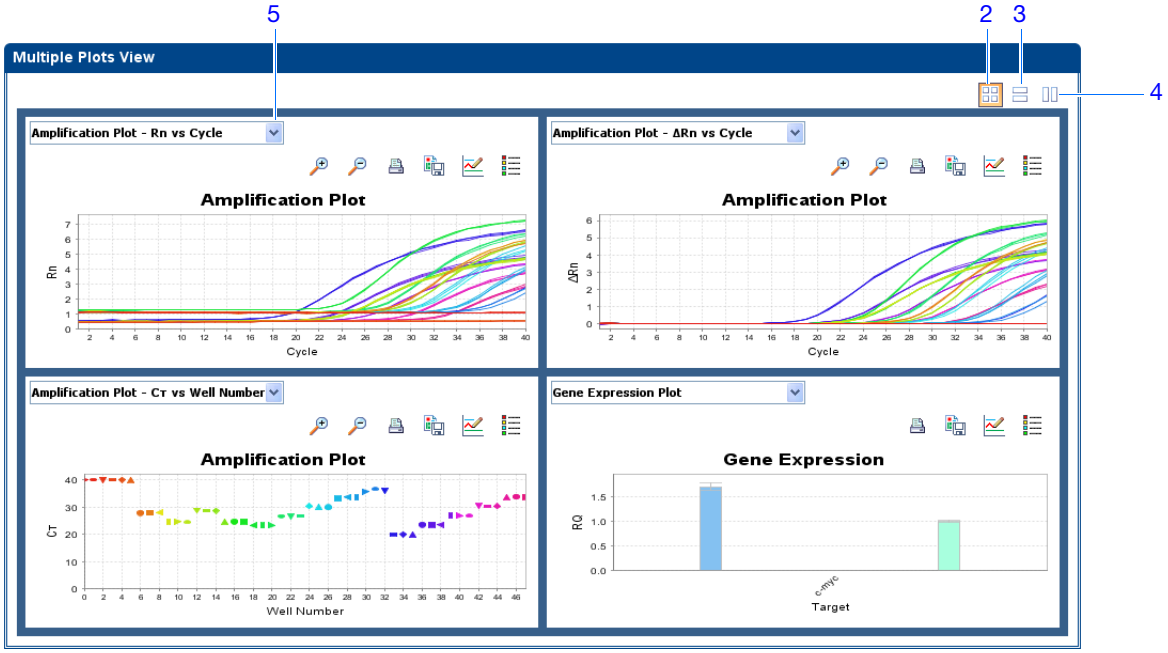


Notas

Cómo ver múltiples gráficas

Utilice la vista Multiple Plots (Múltiples gráficas) para ver simultáneamente hasta cuatro gráficas. Para desplazarse por la vista Multiple Plots (Múltiples gráficas):

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Multiple Plots View** (Vista de múltiples gráficas).
2. Para ver cuatro gráficas, haga clic en **Show plots in a 2 × 2 matrix** (Mostrar gráficas en una matriz de 2 X 2).
3. Para ver dos gráficas en filas, haga clic en **Show plots in two rows** (Ver gráficas en dos filas).
4. Para ver dos gráficas en columnas, haga clic en **Show plots in two columns** (Ver gráficas en dos columnas).
5. Para ver una gráfica específica, seleccione la gráfica en el menú desplegable situado encima de la visualización de cada gráfica.



Notas

Visualización de la curva estándar

La pantalla Standard Curve (Curva estándar) muestra la curva estándar de las muestras designadas como estándares. El software StepOne calcula la cantidad de un gen diana desconocido a partir de la curva estándar.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, se pueden revisar los siguientes valores en la pantalla Standard Curve (Curva estándar):

- Pendiente/eficiencia de amplificación
- Valor R^2 (coeficiente de correlación)
- Valores C_T

Visualización de la curva estándar

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Standard Curve** (Curva estándar).

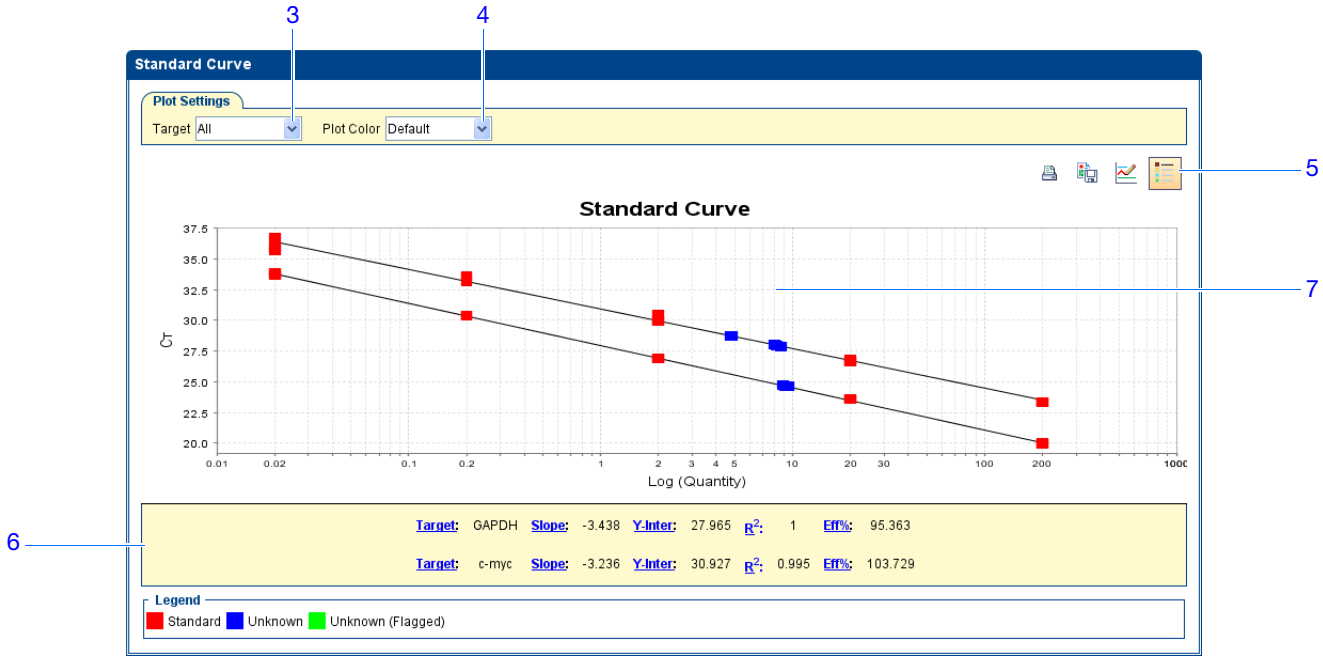
   Nota: Si en la pantalla Standard Curve (Curva estándar) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Para ver los 48 pocillos en la pantalla Standard Curve (Curva estándar), haga clic en la esquina superior izquierda de la disposición de la placa en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa).
3. En el menú desplegable Target (Diana), seleccione **All** (Todas).
4. En el menú desplegable Plot Color (Color de gráfica), seleccione **Default** (Predeterminado).
5. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).
6. Observe los valores que se muestran bajo la curva estándar. En el experimento de ejemplo, los valores de cada gen diana se encuentran en los rangos aceptables:

Diana	Pendiente	Valor R^2	Eficiencia de amplificación (Eff%)
GAPDH	–3,438	1	95,363
c-myc	–3,236	0,995	103,729

7. Compruebe si todas las muestras están dentro del rango de la curva estándar. En el experimento de ejemplo, todas las muestras (puntos azules) están dentro de la curva estándar (puntos rojos).

Notas



8. Compruebe los valores C_T:

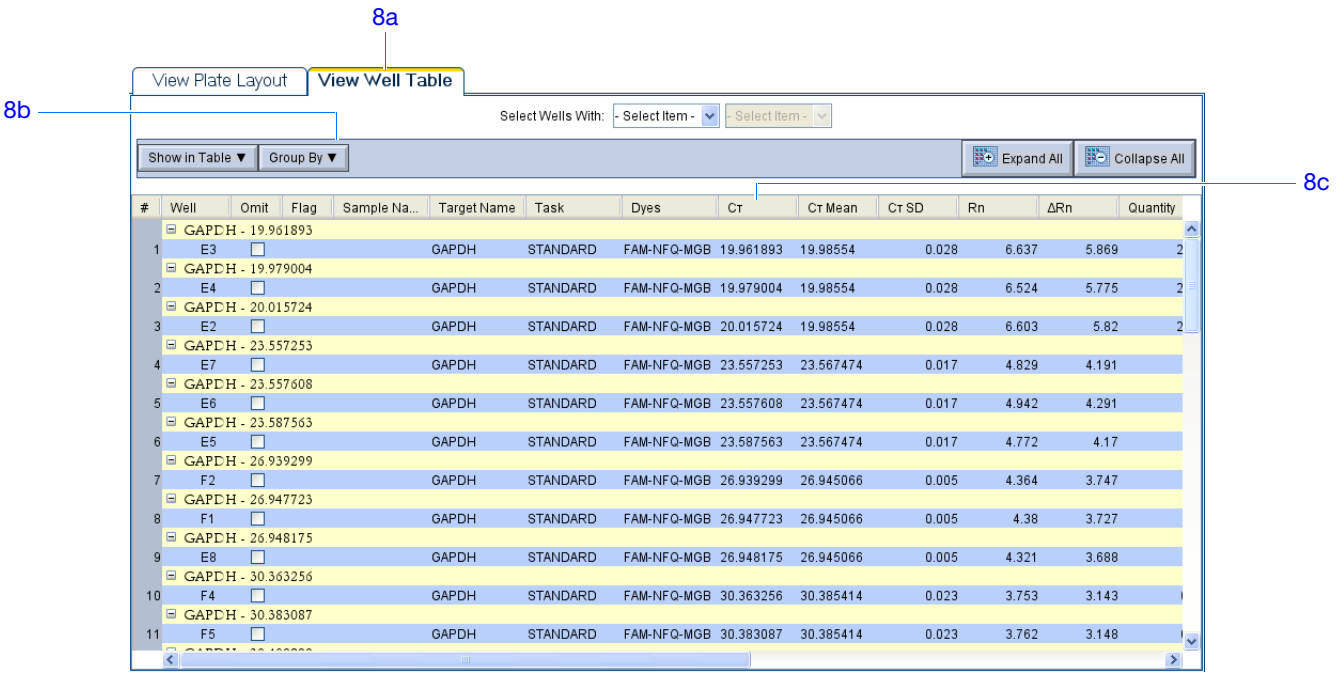
   a. Haga clic en la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).

   b. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Réplica).

   c. Fíjese en los valores de la columna C_T. En el experimento de ejemplo, los valores C_T están dentro del rango esperado (>8 y <35).

   Nota: Los valores C_T de los pocillos D7, D8 y E1 son >35 debido a la poca cantidad de gen diana. No es necesario omitir los pocillos del análisis.

Notas


8a
8b
8c
View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With:
- Select Item -
- Select Item -
Show in Table ▼
Group By ▼
Expand All
Collapse All
Well Omit Flag Sample Na... Target Name Task Dyes CT CT Mean CT SD Rn ΔRn Quantity
GAPDH - 19.961893
1 E3 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 19.961893 19.98554 0.028 6.637 5.869 2
GAPDH - 19.979004
2 E4 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 19.979004 19.98554 0.028 6.524 5.775 2
GAPDH - 20.015724
3 E2 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 20.015724 19.98554 0.028 6.603 5.82 2
GAPDH - 23.557253
4 E7 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 23.557253 23.567474 0.017 4.829 4.191
GAPDH - 23.557608
5 E6 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 23.557608 23.567474 0.017 4.942 4.291
GAPDH - 23.587563
6 E5 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 23.587563 23.567474 0.017 4.772 4.17
GAPDH - 26.939299
7 F2 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 26.939299 26.945066 0.005 4.364 3.747
GAPDH - 26.947723
8 F1 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 26.947723 26.945066 0.005 4.38 3.727
GAPDH - 26.948175
9 E8 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 26.948175 26.945066 0.005 4.321 3.688
GAPDH - 30.363256
10 F4 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 30.363256 30.385414 0.023 3.753 3.143
GAPDH - 30.383087
11 F5 GAPDH STANDARD FAM-NFQ-MGB 30.383087 30.385414 0.023 3.762 3.148

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar relativa, busque:

- **Valores de pendiente/eficiencia de amplificación:** la eficiencia de la amplificación se calcula utilizando la pendiente de la línea de regresión de la curva estándar. Una pendiente próxima al −3,3 indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima, es decir, del 100%. Factores que afectan a la eficiencia de la amplificación:
  - Rango de cantidades estándar: para obtener medidas de la eficiencia más exactas, utilice un amplio rango de cantidades estándar, de 5 a 6 órdenes de magnitud.
  - Número de réplicas estándar: para obtener mediciones más precisas de la eficiencia, incluya réplicas para reducir los efectos de las imprecisiones del pipeteo.
  - Apantalladores de la PCR: los apantalladores de la PCR de la reacción pueden reducir la eficiencia de la amplificación.
- **Valores R^2 (coeficiente de correlación):** el valor R^2 mide cuánto se ajusta la línea de regresión a los puntos de C_T del estándar. El valor 1,00 indica un ajuste perfecto entre la línea de regresión y los puntos de datos. Es deseable que el valor R^2 sea >0,99.
- **Valores C_T:** el ciclo umbral (C_T) es el número de ciclo de PCR en el que la curva de amplificación corta el umbral. Es deseable que el valor C_T sea >8 y <35. Si el valor C_T es <8, eso indica que en la reacción hay demasiado molde. Si el valor C_T es >35, eso indica que en la reacción hay poca cantidad de molde. Cuando los valores C_T son >35, es de esperar que haya una desviación estándar mayor.

Notas

Si el experimento no cumple las directrices anteriores, solucione los problemas de la siguiente forma:

- Omita pocillos (consulte "Omisión de pocillos para el análisis" en la página 118).

  o

- Vuelva a realizar el experimento.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Standard Curve (Curva estándar), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- La eficiencia de la amplificación, consulte *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*.

Revisión de la gráfica de amplificación

En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), se muestra la amplificación de todas las muestras de los pocillos seleccionados. Hay disponibles tres gráficas:

- **ΔR_n vs Cycle** (ΔR_n vs ciclo): ΔRn es la variación de la señal de fluorescencia normalizada generada en cada ciclo de la reacción de PCR y son los datos a partir de los cuales se calcula C_T. En esta gráfica, ΔR_n se muestra en función del número de ciclo. La gráfica sirve para identificar y examinar las amplificaciones irregulares y para ver los valores del umbral y línea basal de la reacción.
- **R_n vs Cycle** (R_n vs ciclo): Rn es la fluorescencia de fluorocromo del notificador normalizada. En esta gráfica, Rn se representa en función del número de ciclo. La gráfica sirve para identificar y examinar las amplificaciones irregulares.
- **C_T vs Well** (C_T vs pocillo): el ciclo umbral (C_T) es el número de ciclo de PCR en el cual el nivel de fluorescencia corta el umbral. En esta gráfica, C_T se representa en función de la posición del pocillo. La gráfica sirve para localizar amplificaciones con valores atípicos.

Cada gráfica se puede ver de las siguientes formas: lineal o log10.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, hay que revisar cada gen diana en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) para buscar:

- Valores de umbral y línea basal correctos
- Valores atípicos

Revisión de la gráfica de amplificación

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación).

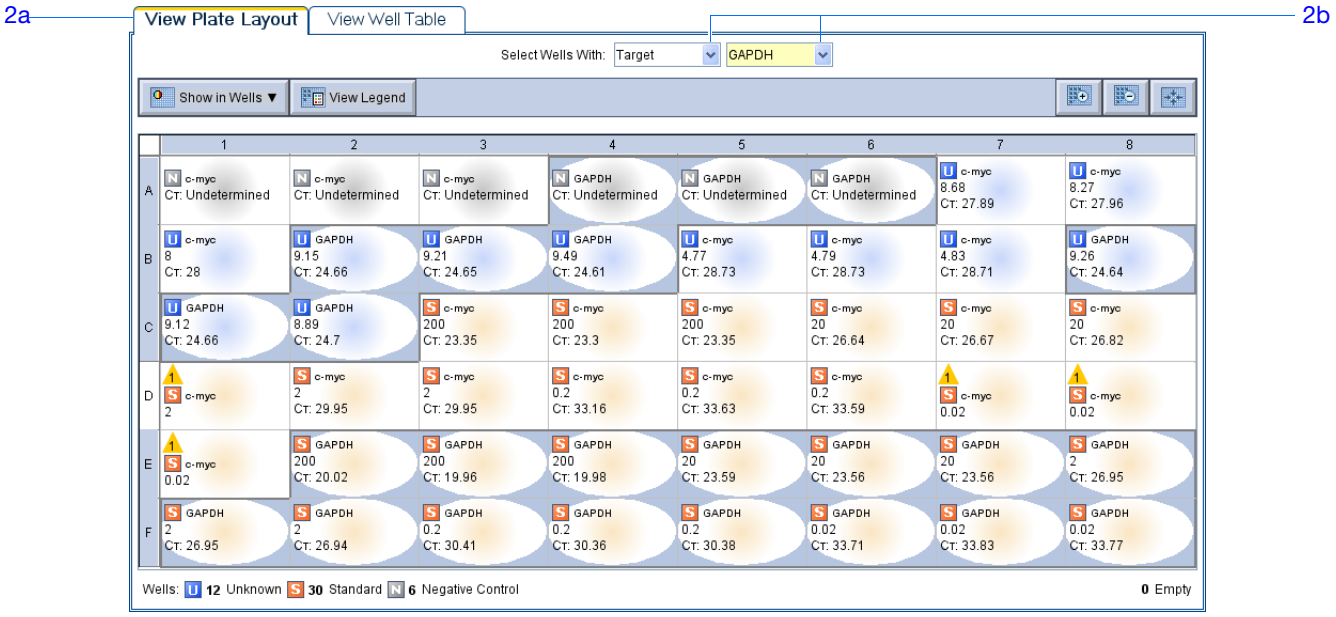
   Nota: Si en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Observe los pocillos de GAPDH en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación):

Notas

a. Haga clic en la ficha **View Plate Layout** (Ver disposición de placa).

b. En los menús desplegables Select Wells With (Seleccionar pocillos con), seleccione **Target** (Diana) y, a continuación, **GAPDH**.



3. En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación):

   a. En el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica), seleccione **ΔR_n vs Cycle** (ΔR_n vs ciclo).

   b. En el menú desplegable Color Plot By (Colorear gráfica por), seleccione **Well** (Pocillo).

   c. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).

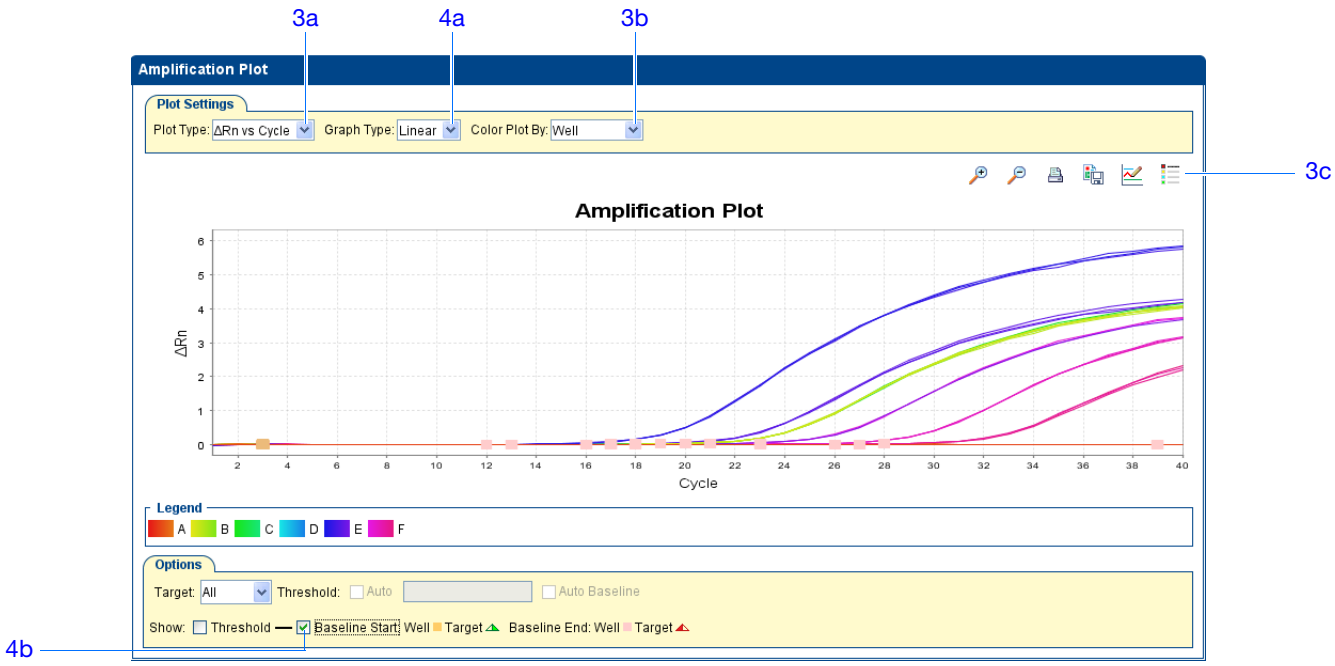
4. Observe los valores de la línea basal:

   a. En el menú desplegable Graph Type (Tipo de gráfica), seleccione **Linear** (Lineal).

   b. Active la casilla de verificación **Baseline** (Línea basal) para ver los ciclos inicial y final de la línea basal.

   c. Compruebe que la línea basal está ajustada correctamente. En el experimento del ejemplo, la línea basal termina antes de que se inicie la amplificación.

Notas



5. Observe los valores de umbral:

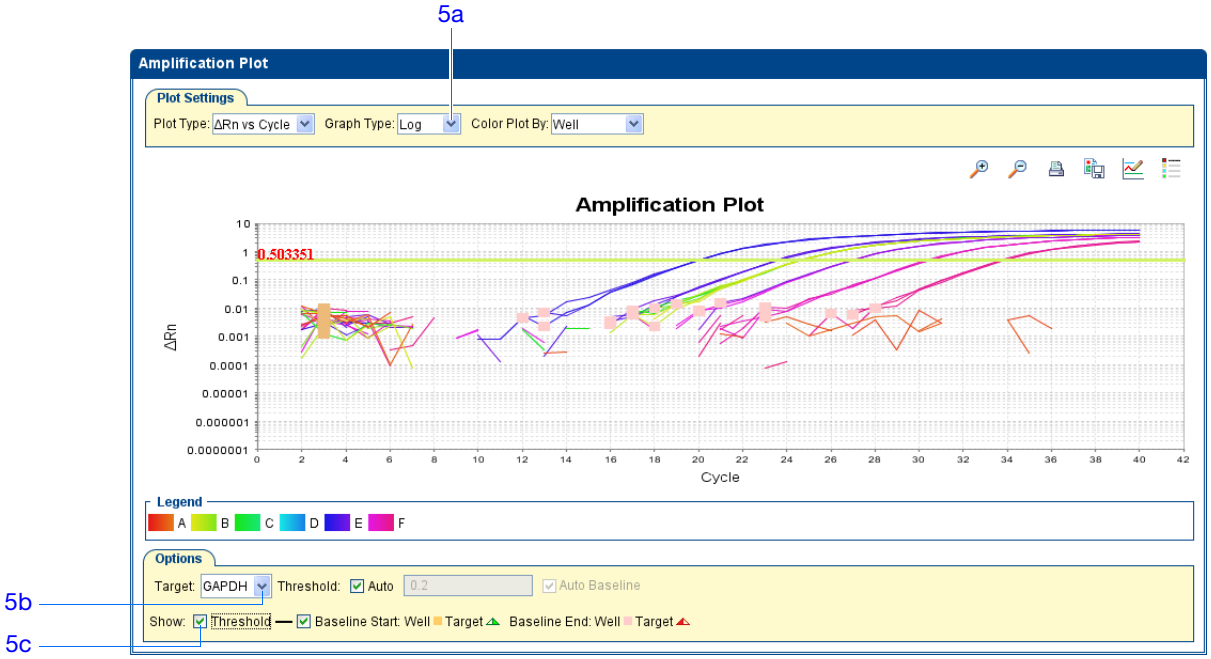
   a. En el menú desplegable Graph Type (Tipo de gráfica), seleccione **Log** (Registro).

   b. En el menú desplegable Target (Diana), seleccione **GAPDH**.

   c. Active la casilla de verificación **Threshold** (Umbral) para ver el umbral.

   d. Compruebe que el umbral está situado correctamente. En el experimento de ejemplo, el umbral está en la fase exponencial.

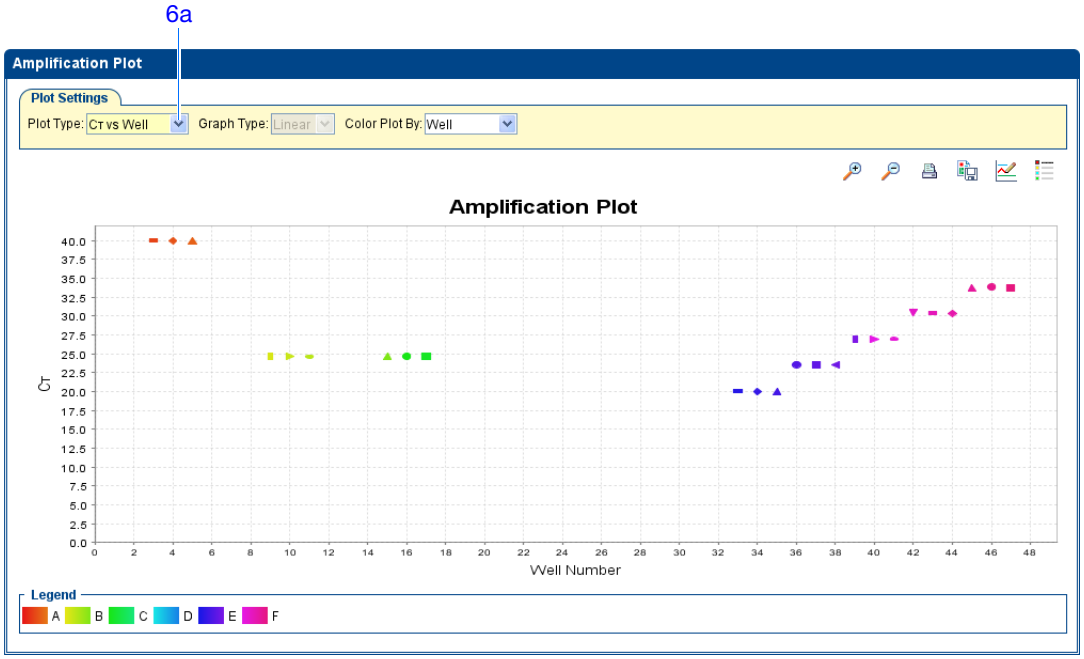
Notas



6. Busque cualquier valor atípico:

   a. En el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica), seleccione **C_T vs Well** (C_T vs pocillo).

   b. Busque pocillos fuera de la curva de amplificación. En el experimento de ejemplo, no hay ningún valor atípico para GAPDH.



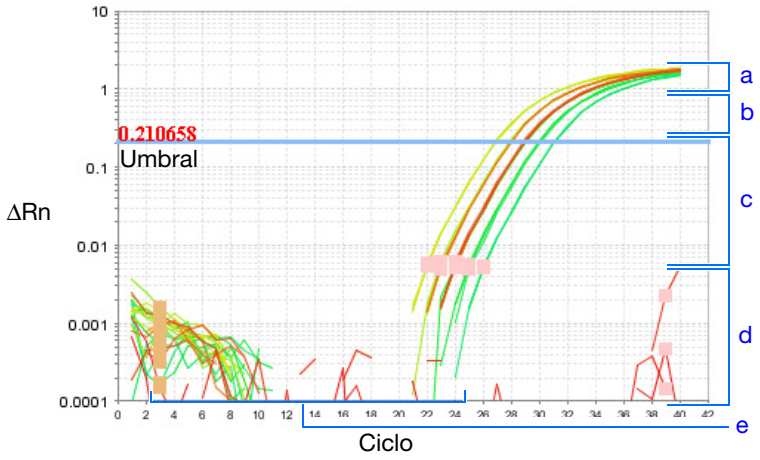
Notas

7. Repita los pasos 2 a 6 para los pocillos de c-myc. En el experimento de ejemplo, hay un valor atípico para el gen c-myc (pocillo D1). Omitirá este pocillo en la sección de solución de problemas ("Omisión de pocillos para el análisis" en la página 118).

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar relativa, busque:

- Los valores de línea basal y umbral correctos: el software StepOne calcula automáticamente los valores de línea basal y umbral dando por hecho que los datos tienen una gráfica de amplificación *típica*. Una gráfica de amplificación típica tiene:
  a. Una fase de meseta o plateau
  b. Una fase lineal
  c. Una fase exponencial (geométrica)
  d. Un determinado ruido de fondo
  e. Una línea basal



¡IMPORTANTE! Los errores en el experimento (por ejemplo, errores de contaminación o pipeteo) pueden producir curvas de amplificación atípicas que pueden derivar a cálculos incorrectos de los valores de línea basal y umbral por parte del software StepOne. Por lo tanto, Applied Biosystems recomienda examinar la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) y revisar los valores de línea basal y umbral asignados a cada pocillo después del análisis.

- Valores atípicos

Si el experimento no cumple las directrices anteriores, solucione los problemas de la siguiente forma:

- Ajuste manualmente la línea basal y/o el umbral (consulte "Revisión de las opciones de análisis" en la página 114).

  O

- Omita pocillos (consulte "Omisión de pocillos para el análisis" en la página 118).

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Revisión de la gráfica de expresión génica y la tabla de pocillos

La pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) muestra los resultados de los cálculos de cuantificación relativa a través del perfil de expresión génica. Hay disponibles dos gráficas:

- **RQ vs Target** (Cuantificación relativa vs diana): agrupa los valores de cuantificación relativa (RQ) por diana. Se traza cada muestra para cada gen diana.
- **RQ vs Sample** (Cuantificación relativa vs muestra): agrupa los valores de cuantificación relativa (RQ) por muestra. Se traza cada gen diana para cada muestra.

  Cada gráfica se puede ver de las siguientes formas: lineal, log10, Ln, log2.

En la tabla de pocillos, se muestran datos de cada pocillo de la placa de reacción, incluidos:

- El nombre de la muestra, el nombre de el gen diana, la tarea y los fluorocromos
- El ciclo umbral calculado (C_T), la fluorescencia normalizada (Rn) y los valores de cantidades
- Avisos

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, se revisa:

- Para cada gen diana de la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) para el nivel de expresión (o cambio en número de veces de la expresión) de la muestra de gen diana en relación con la muestra de referencia.
- La tabla de pocillos para evaluar la precisión de los grupos de réplicas.

Revisión de la gráfica de expresión génica y la tabla de pocillos

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Gene Expression** (Expresión génica).

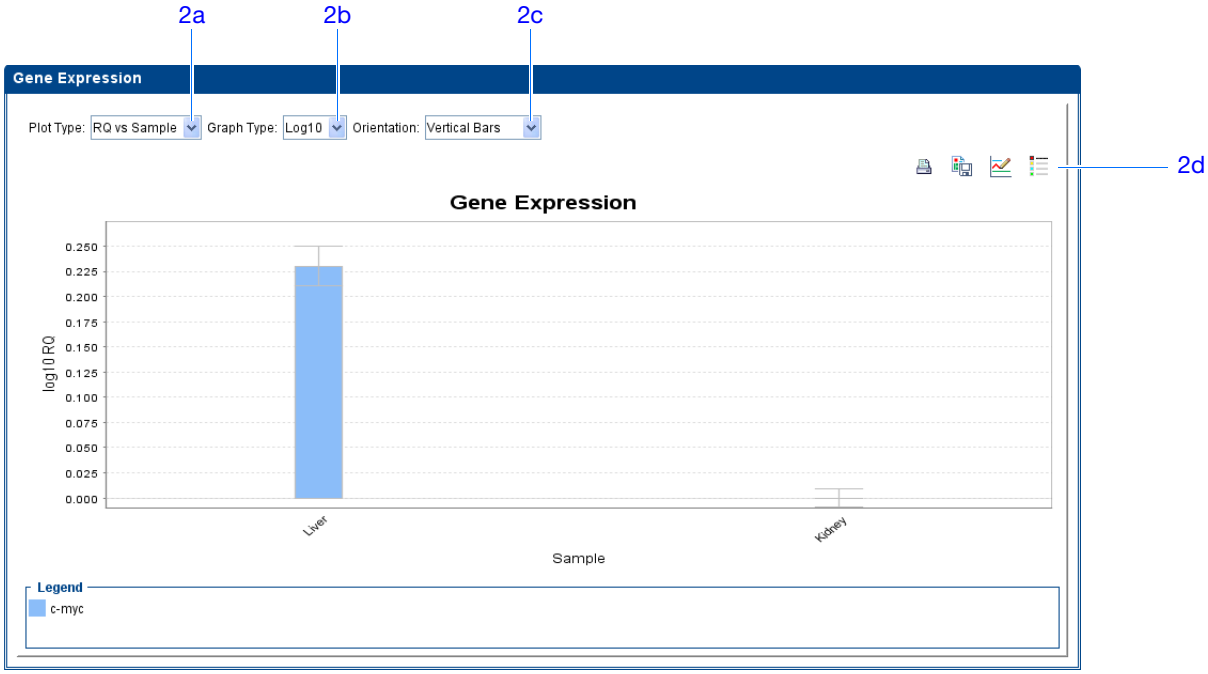
   Nota: Si en la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. En la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica):
   a. En el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica), seleccione **RQ vs Sample** (Cuantificación relativa vs Muestra).
   b. En el menú desplegable Graph Type (Tipo de gráfica), seleccione **Log10**.
   c. En el menú desplegable Orientation (Orientación), seleccione **Vertical Bars** (Barras verticales).

Notas

d. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).

En el experimento de ejemplo, se muestra el nivel de expresión de c-myc en el hígado en relación con su nivel de expresión en la muestra de referencia (riñón). Dado que la muestra de referencia se compara consigo misma, el nivel de expresión es 1. Si el resultado se muestra en el tipo de gráfico Log10, el nivel de expresión de la muestra de referencia aparece como 0 en el gráfico (log10 de 1=0).



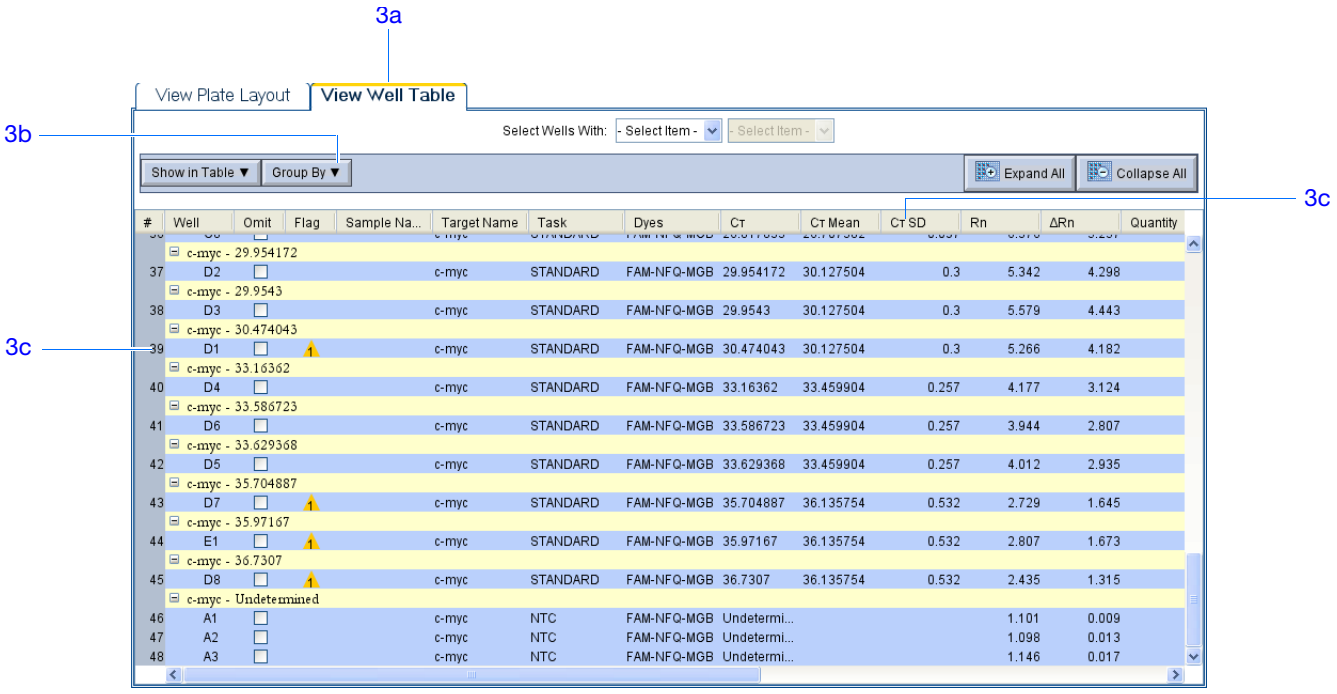
3. Revise la tabla de pocillos:

   a. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación) y, a continuación, seleccione la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).

   b. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Réplica).

   c. Fíjese en la columna C_T SD para evaluar la precisión de los grupos de réplicas. En el experimento de ejemplo, hay un valor atípico (pocillo D1). Este pocillo se omite en la sección de solución de problemas ("Omisión de pocillos para el análisis" en la página 118).

Notas


3a
3b
3c
3c
View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With:
- Select Item -
- Select Item -
Show in Table ▼
Group By ▼
Expand All
Collapse All
Well Omit Flag Sample Na... Target Name Task Dyes CT CT Mean CT SD Rn ΔRn Quantity
c-myc - 29.954172
37 D2 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 29.954172 30.127504 0.3 5.342 4.298
c-myc - 29.9543
38 D3 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 29.9543 30.127504 0.3 5.579 4.443
c-myc - 30.474043
39 D1 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 30.474043 30.127504 0.3 5.266 4.182
c-myc - 33.16362
40 D4 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 33.16362 33.459904 0.257 4.177 3.124
c-myc - 33.586723
41 D6 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 33.586723 33.459904 0.257 3.944 2.807
c-myc - 33.629368
42 D5 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 33.629368 33.459904 0.257 4.012 2.935
c-myc - 35.704887
43 D7 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 35.704887 36.135754 0.532 2.729 1.645
c-myc - 35.97167
44 E1 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 35.97167 36.135754 0.532 2.807 1.673
c-myc - 36.7307
45 D8 c-myc STANDARD FAM-NFQ-MGB 36.7307 36.135754 0.532 2.435 1.315
c-myc - Undetermined
46 A1 c-myc NTC FAM-NFQ-MGB Undetermi... 1.101 0.009
47 A2 c-myc NTC FAM-NFQ-MGB Undetermi... 1.098 0.013
48 A3 c-myc NTC FAM-NFQ-MGB Undetermi... 1.146 0.017

Nota: Para mostrar u ocultar columnas en la tabla de pocillos, marque/desmarque el nombre de columna en el menú desplegable Show in Table (Mostrar en tabla).

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar relativa, busque:

- Diferencias en la expresión génica (como un cambio en número de veces de la expresión) en relación con la muestra de referencia.
- Desviación estándar en los grupos de réplicas (valores C_T SD). Si es preciso, omita los valores atípicos ("Omisión de pocillos para el análisis" en la página 118).

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) o la tabla de pocillos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Presentación de los datos

Hay distintas formas de presentar los datos del experimento:

- Guardando la gráfica como un archivo de imagen
- Imprimiendo la gráfica
- Imprimiendo la disposición de la placa
- Creando diapositivas
- Imprimiendo un informe
- Exportando datos

Para obtener más información acerca de estos procedimientos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Notas

Sección 5.2 Solución de problemas

Esta sección cubre los siguientes temas:

- Revisión de las opciones de análisis 114
- Revisión del resumen QC 116
- Omisión de pocillos para el análisis 118
- Revisión de la gráfica multicomponente 120
- Revisión de la gráfica de datos brutos 122

Notas

Revisión de las opciones de análisis

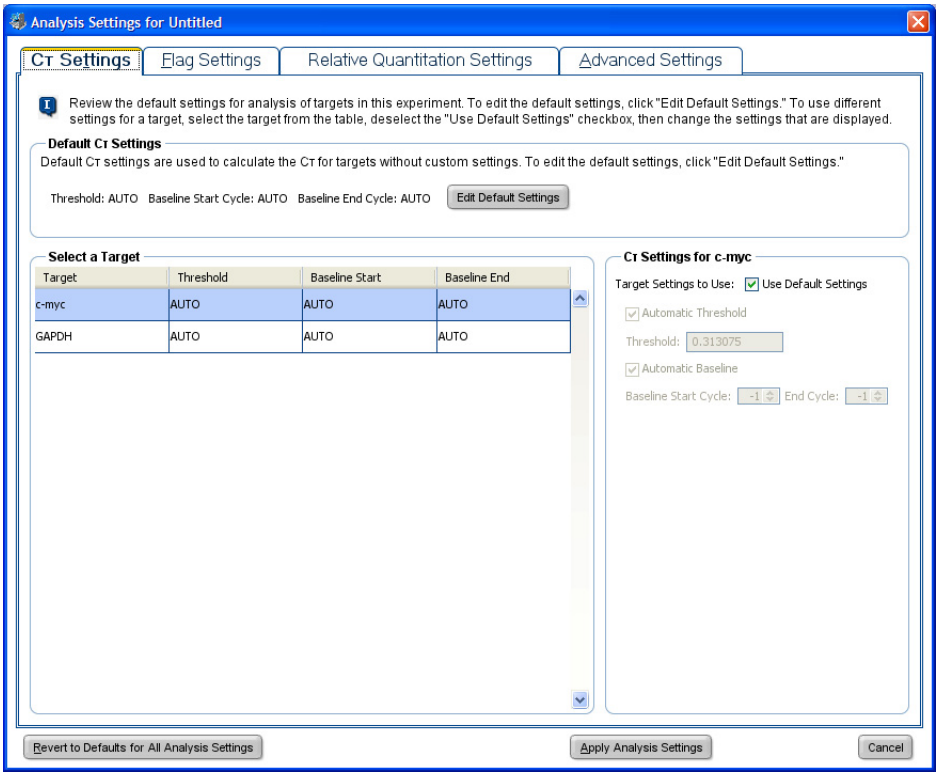
El cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis) muestra las opciones de análisis del ciclo umbral (C_T), los avisos, la cuantificación relativa y las opciones avanzadas. Si las opciones de análisis predeterminadas del software StepOne no son adecuadas para el experimento, puede cambiarlas en el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis) y, a continuación, volver a analizar el experimento.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, se utilizan las opciones de análisis predeterminadas sin ningún cambio.

Revisión de las opciones de análisis

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis).
2. Haga clic en **Analysis Settings** (Opciones de análisis) para abrir el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis).
3. En el experimento de ejemplo, se utilizan opciones de análisis para cada ficha:
   - C_T Settings (Opciones de C_T)
   - Flag Settings (Opciones de avisos)
   - Relative Quantification Settings (Opciones de cuantificación relativa)
   - Advanced Settings (Opciones avanzadas)


Analysis Settings for Untitled
CT Settings
Flag Settings
Relative Quantitation Settings
Advanced Settings
Review the default settings for analysis of targets in this experiment. To edit the default settings, click "Edit Default Settings." To use different settings for a target, select the target from the table, deselect the "Use Default Settings" checkbox, then change the settings that are displayed.
Default CT Settings
Default CT settings are used to calculate the CT for targets without custom settings. To edit the default settings, click "Edit Default Settings."
Threshold: AUTO Baseline Start Cycle: AUTO Baseline End Cycle: AUTO
Edit Default Settings
Select a Target
Target
Threshold
Baseline Start
Baseline End
c-myc
AUTO
AUTO
AUTO
GAPDH
AUTO
AUTO
AUTO
CT Settings for c-myc
Target Settings to Use:
Use Default Settings
Automatic Threshold
Threshold:
0.313075
Automatic Baseline
Baseline Start Cycle:
-1
End Cycle:
-1
Revert to Defaults for All Analysis Settings
Apply Analysis Settings
Cancel

Notas

Directrices de análisis

A menos que ya haya determinado cuál son las opciones óptimas para el experimento, utilice las opciones de análisis predeterminadas en el software StepOne. Si las opciones predeterminadas no son adecuadas para el experimento, puede cambiar:

- **C_T Settings** (Opciones de C_T): utilice esta ficha para ajustar manualmente el umbral y la línea basal. Si ajusta manualmente el umbral y la línea basal, Applied Biosystems recomienda lo siguiente:

Opción	Recomendación
Umbral	Introduzca un valor para el umbral de manera que: • Esté por encima del ruido de fondo. • Esté por debajo de las fases de meseta o plateau y fase lineal de la curva de amplificación. • Esté dentro de la fase exponencial de la curva de amplificación.
Línea basal	Seleccione los valores Start Cycle (Ciclo inicial) y End Cycle (Ciclo final) antes de que comience la amplificación.

- **Flag Settings** (Opciones de avisos): utilice esta ficha para:
  - Ajustar la sensibilidad para que se marquen más o menos pocillos.
  - Cambiar los parámetros de los avisos que aplica el software StepOne.
- **Relative Quantitation Settings** (Opciones de cuantificación relativa): utilice esta ficha para:
  - Cambiar la muestra de referencia y/o el control endógeno.
  - Seleccionar el algoritmo que se debe utilizar para determinar los valores mínimos y máximos de RQ (nivel de confianza o desviaciones estándar).
- **Advanced Settings** (Opciones avanzadas): utilice esta ficha para cambiar las opciones de línea basal pocillo a pocillo.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de las opciones de análisis, acceda al software StepOne pulsando **F1** cuando se abra el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis).

Notas

Revisión del resumen QC

La pantalla QC Summary (Resumen QC) muestra una lista de avisos del software StepOne, e incluye la frecuencia y ubicación de los mismos en el experimento abierto.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, hay que revisar la pantalla QC Summary (Resumen QC) para saber si los datos del experimento han desencadenado algún aviso:

- Los pocillos D7, D8 y E1 han producido datos que han desencadenado el aviso HIGHSD.
- El pocillo D1 ha producido datos que han desencadenado el aviso OUTLIERRG.

Revisión del resumen QC

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **QC Summary** (Resumen QC).

   Nota: Si en la pantalla QC Summary (Resumen QC) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

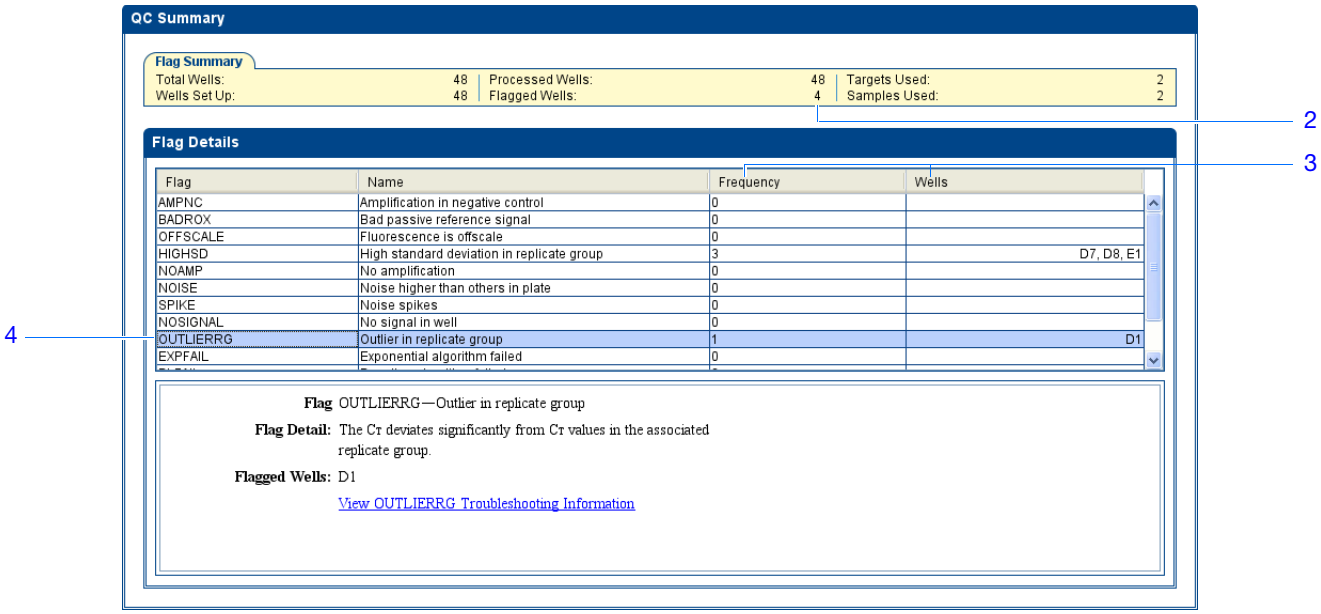
2. Revise el resumen de avisos. En el experimento de ejemplo, hay 4 pocillos marcados.

3. En la tabla Flag Details (Detalles de aviso), observe las columnas Frequency (Frecuencia) y Wells (Pocillos) para determinar qué avisos aparecen en el experimento. En el experimento de ejemplo:
   - El aviso HIGHSD aparece 3 veces, en los pocillos D7, D8 y E1.
   - El aviso OUTLIERRG aparece 1 vez en el pocillo D1.

   Nota: Un valor 0 en la columna Frequency (Frecuencia) indica que el aviso no aparece en el experimento.

4. Por cada aviso que aparezca en el experimento, haga clic en la fila de avisos para ver información detallada acerca del aviso. En el experimento de ejemplo:
   a. El aviso HIGHSD (pocillos D7, D8 y E1) indica una gran desviación estándar en el grupo de réplicas. Esto es lo esperado para los valores C_T >35 debido a la poca cantidad de gen diana. No es necesario omitir los pocillos del análisis.
   b. El aviso OUTLIERRG (pocillo D1) indica que en el grupo de réplicas hay un valor atípico. Vaya a "Omisión de pocillos para el análisis" en la página 118 para quitar el pocillo D1.

Notas


QC Summary
Flag Summary
Total Wells: 48
Wells Set Up: 48
Processed Wells: 48
Flagged Wells: 4
Targets Used: 2
Samples Used: 2
Flag Details
Flag
Name
Frequency
Wells
AMPNC Amplification in negative control 0
BADROX Bad passive reference signal 0
OFFSCALE Fluorescence is offscale 0
HIGHSD High standard deviation in replicate group 3 D7, D8, E1
NOAMP No amplification 0
NOISE Noise higher than others in plate 0
SPIKE Noise spikes 0
NOSIGNAL No signal in well 0
OUTLIERRG Outlier in replicate group 1 D1
EXPFAIL Exponential algorithm failed 0
Flag OUTLIERRG—Outlier in replicate group
Flag Detail: The Cr deviates significantly from Cr values in the associated replicate group.
Flagged Wells: D1
View OUTLIERRG Troubleshooting Information
2
3
4

Posibles avisos

En los experimentos de curva estándar relativa, los datos del experimento pueden desencadenar los avisos que se indican a continuación.

Si en el experimento no aparece un aviso, su frecuencia será 0. Si la frecuencia es >0, eso significa que el aviso aparece en algún lugar del experimento. La posición del pocillo se indica en la columna Wells (Pocillos).

Aviso	Descripción
AMPNC	Amplificación en control negativo
BADROX	Señal de referencia pasiva incorrecta
BLFAIL	Error del algoritmo de línea basal
CTFAIL	Error del algoritmo C_T
EXPFAIL	Error del algoritmo exponencial
HIGHSD	Desviación estándar alta en el grupo de réplicas
NOAMP	No hay amplificación
NOISE	Ruido mayor que otros pocillos en la placa
NOSIGNAL	No hay señal en el pocillo
OFFSCALE	La fluorescencia está fuera de la escala
OUTLIERRG	Valor atípico en el grupo de réplicas
SPIKE	Picos de ruido
THOLDFAIL	Error en el algoritmo del umbral

Notas

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar relativa:

- Haga clic en cada aviso de la tabla Flag Details (Detalles de avisos) con una frecuencia >0 para ver información detallada acerca del aviso. Si es necesario, haga clic en el vínculo de solución de problemas para saber cómo corregir el aviso.
- Puede cambiar las opciones de los avisos:
  - Ajustar la sensibilidad para que se marquen más o menos pocillos.
  - Cambiar los parámetros de los avisos que aplica el software StepOne.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla QC Summary (Resumen QC) o de las opciones de avisos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Omisión de pocillos para el análisis

Los errores de los experimentos pueden causar que algunos pocillos se amplifiquen de manera insuficiente o no se amplifiquen. Estos pocillos suelen producir valores C_T que difieren significativamente de los valores medios de los pocillos de réplicas asociadas. Si se incluyen en los cálculos, estos valores atípicos pueden dar lugar a mediciones erróneas; para garantizar la precisión, omita los valores atípicos del análisis.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, se utiliza la tabla de pocillos para quitar el pocillo D1 del análisis. El pocillo D1 está marcado con el aviso OUTLIERRG (consulte "Revisión del resumen QC" en la página 116).

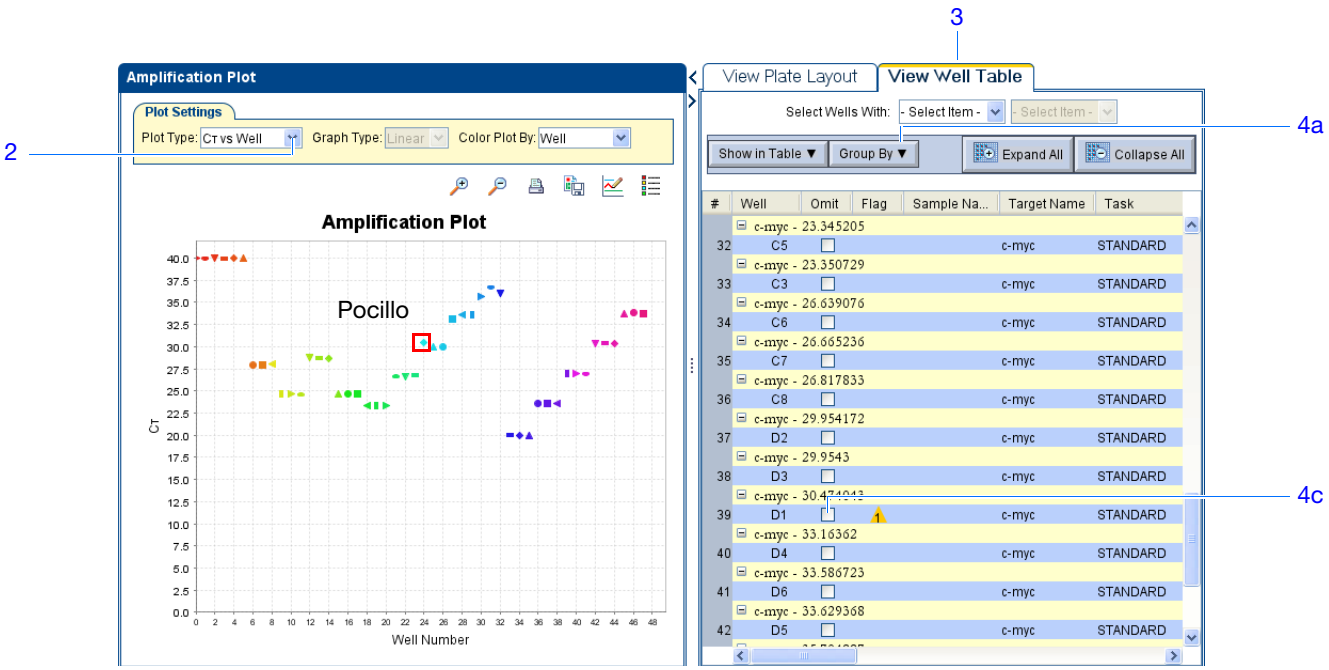
Omisión de pocillos

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación).

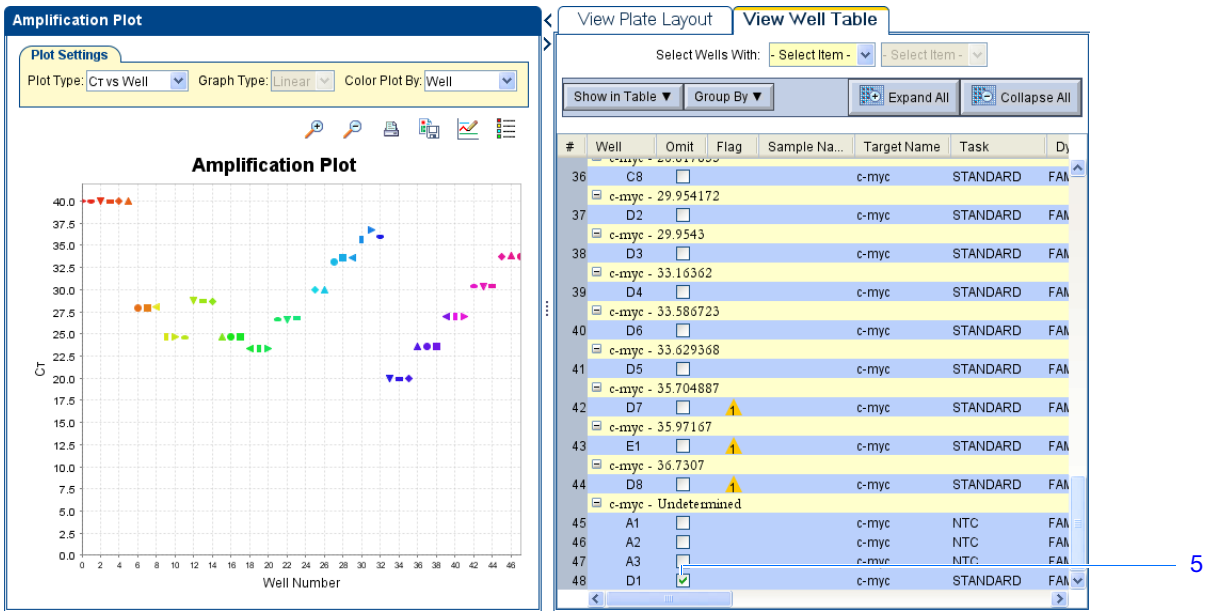
   Nota: Si en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), seleccione **C_T vs Well** (C_T vs pocillo) en el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica).
3. Seleccione la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).
4. En la tabla de pocillos:
   a. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Réplica).
   b. Fíjese si en el grupo de réplicas hay algún valor atípico (asegúrese de que están marcados con un aviso). En el experimento de ejemplo, el pocillo D1 es un valor atípico.
   c. Active la casilla de verificación **Omit** (Omitir) junto al pocillo D1.

Notas



5. Haga clic en **Analyze** (Analizar) para volver a analizar los datos del experimento sin el pocillo D1.



Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar relativa, fíjese bien si en los grupos de réplicas hay valores atípicos. Si es necesario, quite manualmente los valores atípicos con la tabla de pocillos. Siga el procedimiento "Omisión de pocillos" anterior para quitar los valores atípicos del experimento.

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la omisión de pocillos para el análisis, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**. En la ayuda, busque los temas relacionados con la omisión de pocillos:

1. Haga clic en la ficha **Search** (Buscar).
2. Escriba **omit well** (omisión de pocillos).
3. Haga clic en **List Topics** (Ver temas).
4. Haga doble clic en los temas que desee leer.

Revisión de la gráfica multicomponente

La pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) muestra la contribución espectral completa de cada fluorocromo de un pocillo seleccionado durante el tiempo que dura el proceso de PCR.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) hay que fijarse en:

- Fluorocromo ROX™ (referencia pasiva)
- Fluorocromo FAM™ (notificador)
- Picos, depresiones y/o cambios repentinos
- Amplificación en pocillos de control negativo

Revisión de la gráfica multicomponente

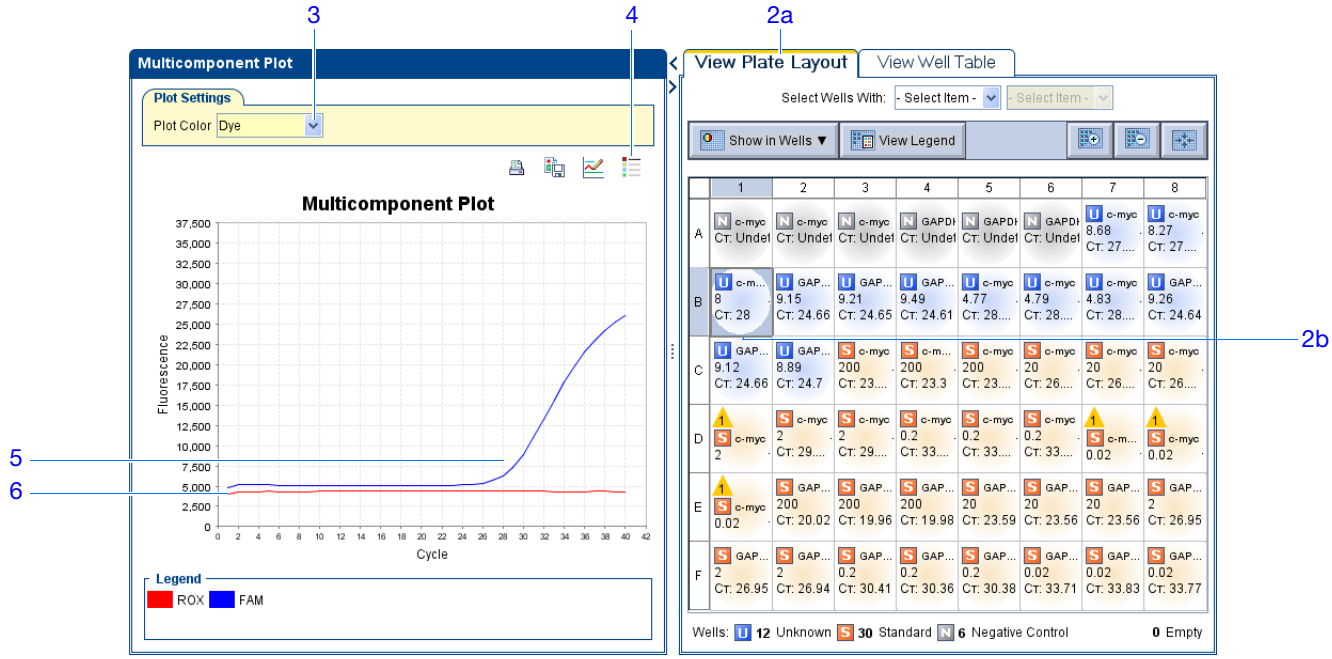
1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Multicomponent Plot** (Gráfica multicomponente).

   Nota: Si en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

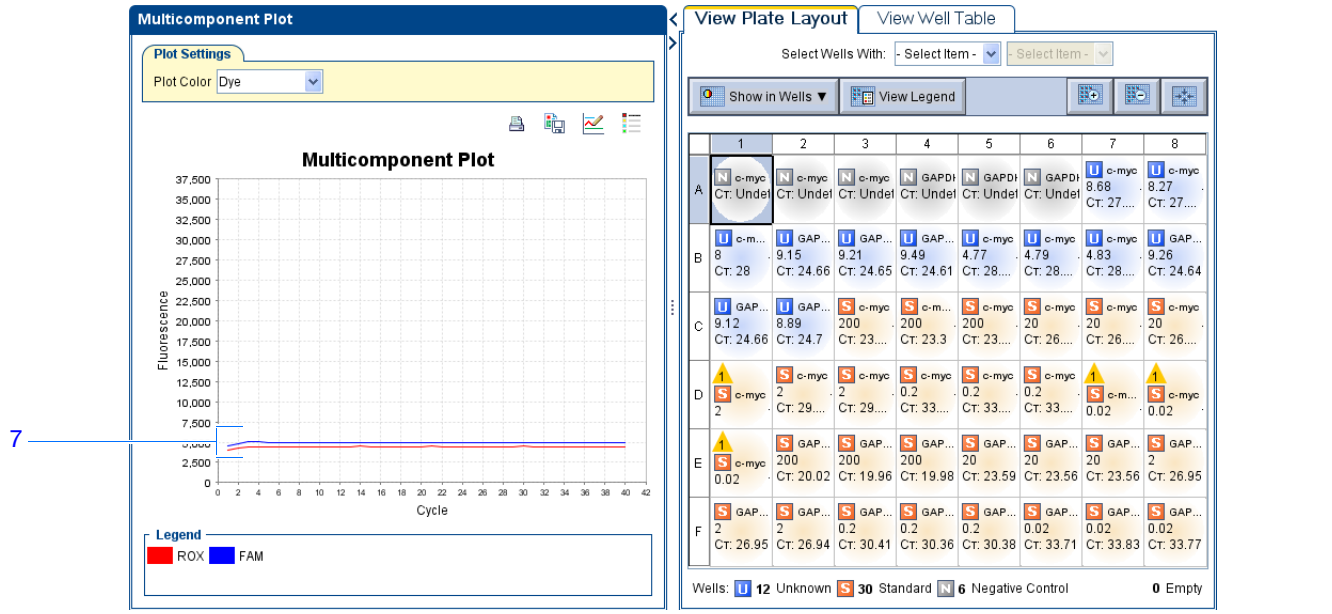
2. Muestre un solo pocillo a la vez en la pantalla Multicomponente Plot (Gráfica multicomponente):
   a. Haga clic en la ficha **View Plate Layout** (Ver disposición de placa).
   b. Seleccione un pocillo en la disposición de la placa; el pocillo se muestra en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente).
3. En el menú desplegable Plot Color (Color de gráfica), seleccione **Dye** (Fluorocromo).
4. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).
5. Compruebe la señal del fluorocromo FAM. En el experimento de ejemplo, la señal del fluorocromo FAM aumenta a lo largo de la reacción de PCR, lo que indica que la amplificación es normal.

Notas

6. Compruebe la señal del fluorocromo ROX. En el experimento de ejemplo, la señal del fluorocromo ROX permanece constante a lo largo de la reacción de PCR, lo que indica que los datos son típicos.



7. Seleccione de uno en uno los pocillos de control negativo y compruebe la amplificación. En el experimento de ejemplo, no hay amplificación en los pocillos de control negativo.



Notas

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar relativa, busque:

- Referencia pasiva: el nivel de fluorescencia del fluorocromo de referencia pasiva debe permanecer relativamente constante a lo largo de la reacción de PCR.
- Fluorocromo del notificador: el nivel de fluorescencia del fluorocromo del notificador debería presentar una región plana que se corresponde con la línea basal, seguida por un rápido aumento en la fluorescencia a medida que la amplificación continúa.
- Cualquier irregularidad de la señal: no debería haber ningún pico, depresión ni cambio súbito en la señal fluorescente.
- Pocillos de control negativo: no debería haber ninguna amplificación en los pocillos de control negativo.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Revisión de la gráfica de datos brutos

En la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), se muestra la señal de fluorescencia bruta (no normalizada) para cada filtro óptico de los pocillos seleccionados durante cada ciclo de la PCR a tiempo real.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de curva estándar relativa de ejemplo, hay que revisar la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) para comprobar si hay un aumento estable de la señal (que no hay ninguna depresión ni cambio abrupto) a partir del filtro apropiado.

Revisión de la gráfica de datos brutos

1. En el panel Experiment Menu (Menú de experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Raw Data Plot** (Gráfica de datos brutos).

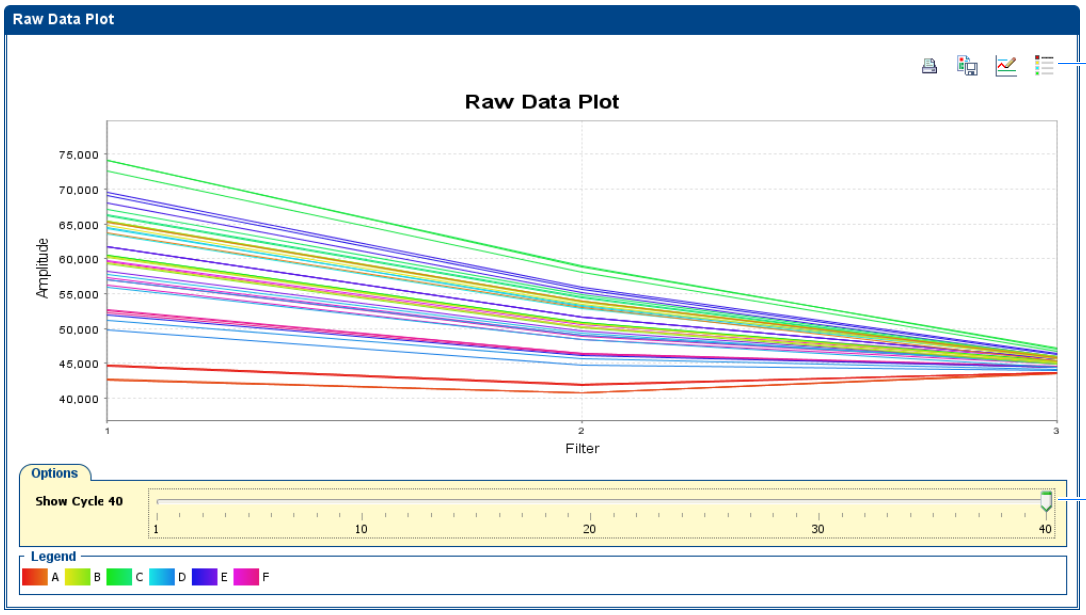
   Nota: Si en la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Para ver los 48 pocillos en la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), haga clic en la esquina superior izquierda de la disposición de la placa en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa).

3. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).

4. Haga clic y arrastre el puntero Show Cycle (Mostrar ciclo) desde el ciclo 1 al 40. En el experimento de ejemplo, hay un aumento estable en la señal desde el filtro 1, que se corresponde con el filtro del fluorocromo FAM™.

Notas



Los filtros del sistema StepOne™ son:

Filtro	Fluorocromo
1	Fluorocromo FAM™
	Fluorocromo SYBR® Green
2	Fluorocromo JOE™
	Fluorocromo VIC®
3	Fluorocromo™ROX

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de curva estándar relativa, fíjese en lo siguiente para cada filtro:

- Crecimiento característico de la señal
- Depresiones o cambios abruptos

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Notas

6 Diseño del experimento de C_T comparativos

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Resumen del capítulo 126
- Creación de un nuevo experimento 127
- Definición de las propiedades del experimento 129
- Definición de los métodos y materiales 131
- Configuración de los genes diana 135
- Configuración de las muestras 137
- Configuración de las opciones de cuantificación relativa 140
- Configuración del protocolo de termociclado 141
- Revisión de la configuración de la reacción 142
- Solicitud de materiales para el experimento 148
- Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño 152

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

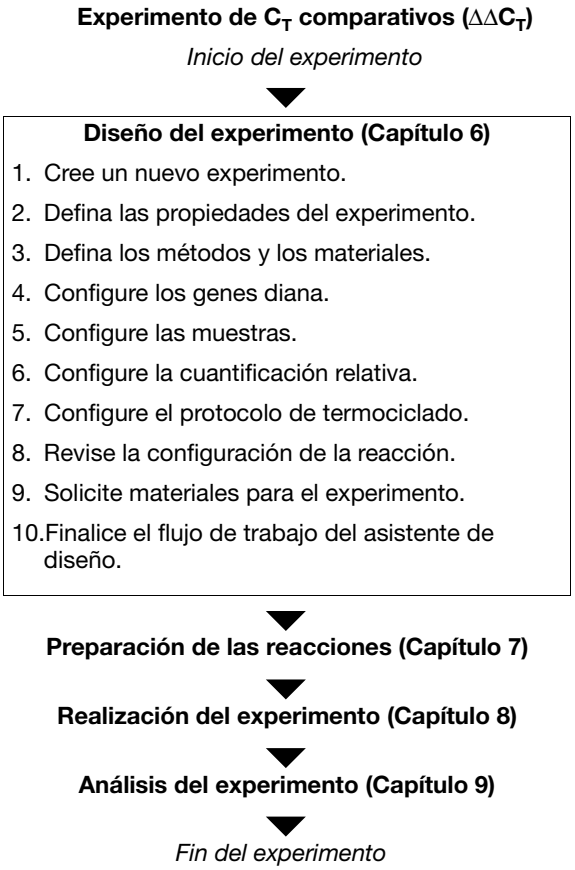
Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo utilizar el asistente de diseño en el software StepOne™ para configurar el experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$). El asistente de diseño le guiará por los procedimientos óptimos recomendados por Applied Biosystems a medida que vaya introduciendo los parámetros de diseño del experimento de ejemplo.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para diseñar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.

Nota: Diseñe el experimento de ejemplo con el flujo de trabajo del asistente de diseño del software StepOne. Cuando diseñe sus propios experimentos, puede seleccionar flujos de trabajo alternativos (consulte "Uso de esta guía con sus propios experimentos" en la página 9).


Experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$)
Inicio del experimento
Diseño del experimento (Capítulo 6)
1. Cree un nuevo experimento.
2. Defina las propiedades del experimento.
3. Defina los métodos y los materiales.
4. Configure los genes diana.
5. Configure las muestras.
6. Configure la cuantificación relativa.
7. Configure el protocolo de termociclado.
8. Revise la configuración de la reacción.
9. Solicite materiales para el experimento.
10. Finalice el flujo de trabajo del asistente de diseño.
Preparación de las reacciones (Capítulo 7)
Realización del experimento (Capítulo 8)
Análisis del experimento (Capítulo 9)
Fin del experimento

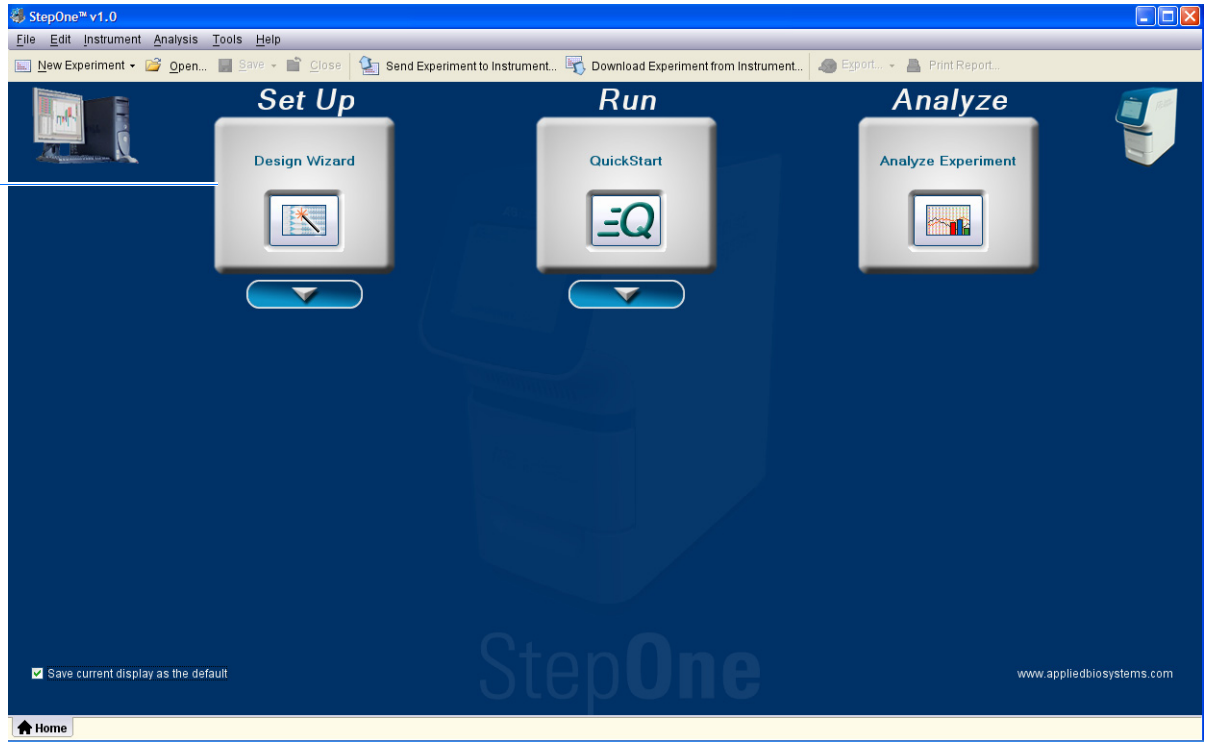
Notas

Creación de un nuevo experimento

Cree un experimento nuevo con el asistente de diseño del software StepOne.

Creación de un experimento

1. Haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Design Wizard** (Asistente de diseño) para abrir el asistente de diseño.



3. Consulte "Elementos del software" más adelante para obtener información acerca de la navegación por el asistente de diseño.

Elementos del software

A continuación, se ilustran los elementos del software StepOne para el asistente de diseño.

1. Barra de menús: muestra los menús disponibles en el software:
   - File (Archivo)
   - Edit (Edición)
   - Instrument (Instrumento)
   - Analysis (Análisis)
   - Tools (Herramientas)
   - Help (Ayuda)

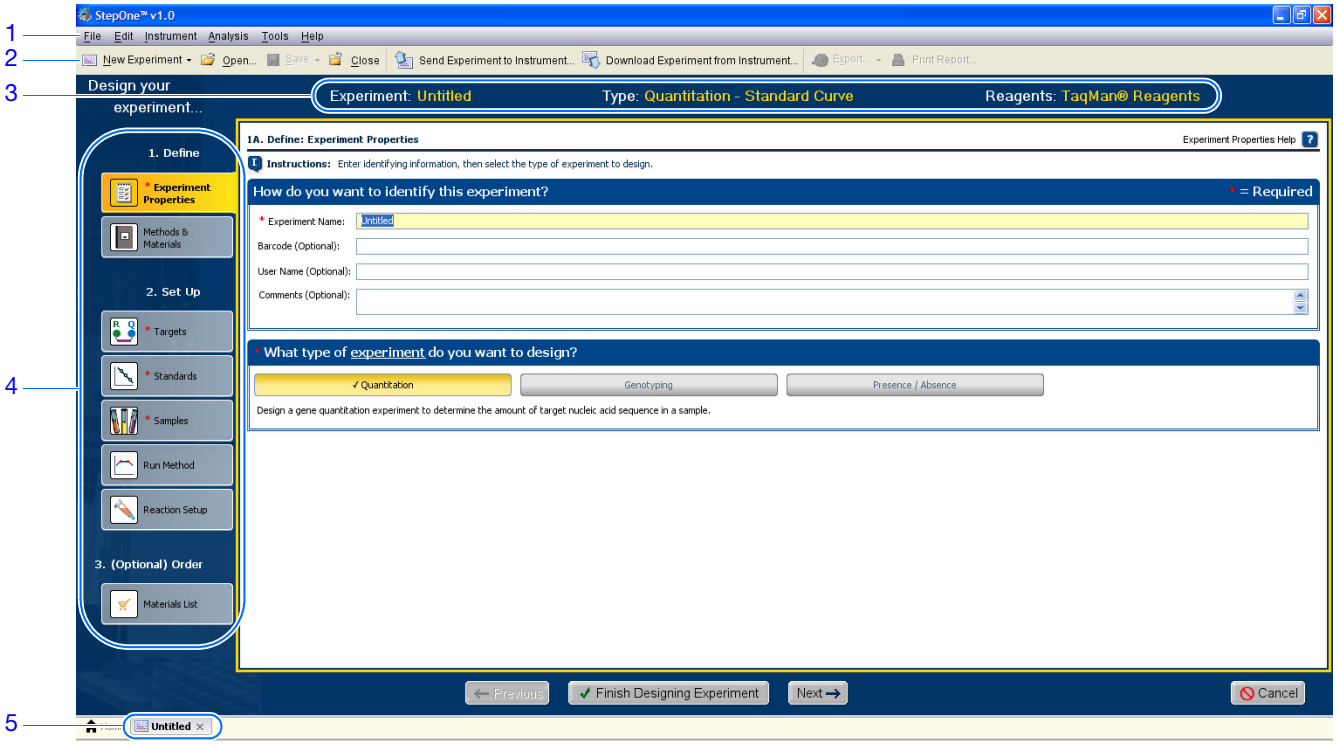
Notas

2. Barra de herramientas: muestra las herramientas disponibles en el software:
   - New Experiment (Experimento nuevo)
   - Open (Abrir)
   - Close (Cerrar)
   - Send Experiment to Instrument (Enviar experimento al instrumento)
   - Download Experiment from Instrument (Descargar experimento del instrumento)
3. Cabecera del experimento: indica el nombre del experimento, el tipo de experimento y los reactivos del experimento abierto.
4. Panel de navegación: ofrece enlaces a todas las pantallas del asistente de diseño:
   - Experiment Properties (Propiedades del experimento)
   - Methods & Materials (Métodos y materiales)
   - Targets (Dianas)
   - Opciones de cuantificación relativa
   - Samples (Muestras)
   - Run Method (Protocolo de termociclado)
   - Reaction Setup (Configuración de la reacción)
   - Materials List (Lista de materiales)

Nota: Inicialmente, el asistente de diseño muestra el tipo de experimento Quantitation - Standard Curve (Cuantificación: curva estándar). Las pantallas disponibles de este asistente pueden cambiar si se selecciona otro tipo de experimento. Por ejemplo, la pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa) no aparece hasta que se selecciona el tipo de experimento de curva estándar o C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$).

Notas

5. Fichas del experimento: se muestra una ficha por cada experimento abierto.



Definición de las propiedades del experimento

En la pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento), escriba la información de identificación del experimento y, a continuación, seleccione el tipo de experimento que desea diseñar.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) de ejemplo:

- El experimento se identifica como un ejemplo.
- Se utiliza una MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate.
- El tipo de experimento es de cuantificación.

Pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento)

1. Haga clic en el campo **Experiment Name** (Nombre de experimento) y, a continuación, escriba **Comparative C_T Example** (Ejemplo de C_T comparativos).

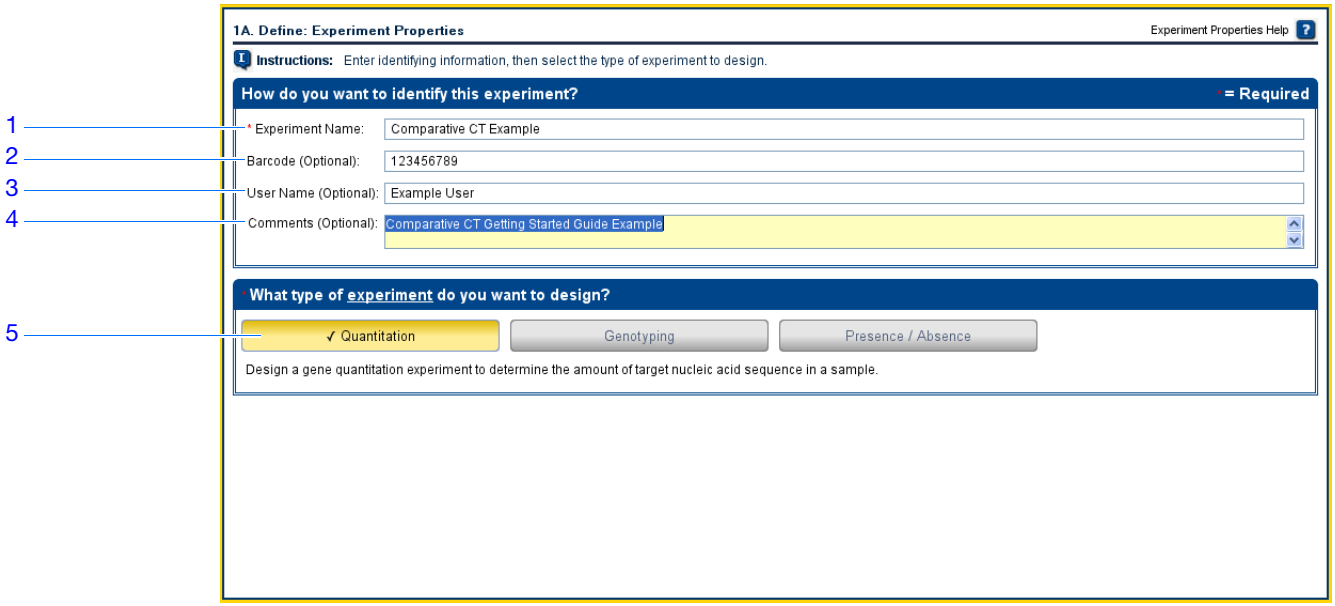
   Nota: La cabecera del experimento se actualiza con el nombre del experimento que acaba de escribir.

2. Haga clic en el campo **Barcode** (Código de barras) y, a continuación, escriba el código de barras en la placa de reacción de PCR.

3. Haga clic en el campo **User Name** (Nombre de usuario) y, a continuación, escriba **Example User** (Usuario de ejemplo).

Notas

4. Haga clic en el campo **Comments** (Comentarios) y, a continuación, escriba **Comparative CT Getting Started Guide Example** (Ejemplo de la guía de introducción del CT comparativos).
5. Seleccione **Quantitation** (Cuantificación) en el tipo de experimento.
6. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.



Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Escriba un nombre para el experimento que sea descriptivo y fácil de recordar. El nombre del experimento se utiliza como nombre de archivo predeterminado del experimento. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Experiment Name (Nombre de experimento).

  Nota: No se pueden utilizar los siguientes caracteres en en campo Experiment Name (Nombre de experimento): barra inclinada hacia delante (/), barra inclinada hacia atrás (\), signo mayor que (>), signo menor que (<), asterisco (*), signo de interrogación (?), comillas ("), línea vertical (|), dos puntos (:) o punto y coma (;).

- Utilice MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates, MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips o MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps. Los consumibles tipo rápido se pueden utilizar con reactivos tipo rápido y estándar.
- *(Opcional)* Introduzca un código de barras para identificarlo en la placa de reacción de PCR. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Barcode (Código de barras).
- *(Opcional)* Escriba un nombre de usuario para identificar al propietario del experimento. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo User Name (Nombre de usuario).
- *(Opcional)* Escriba comentarios para describir el experimento. Puede introducir hasta 1000 caracteres en el campo Comments (Comentarios).

Notas

- Seleccione **Quantitation** (Cuantificación) en el tipo de experimento.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- Consumibles, consulte "Consumibles admitidos" en la página 3.
- Experimentos de cuantificación, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Definición de los métodos y materiales

En la pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales), seleccione el método de cuantificación, los reactivos, la velocidad de rampa y el tipo de molde de PCR que se van a utilizar en el experimento.

Acerca del experimento de ejemplo

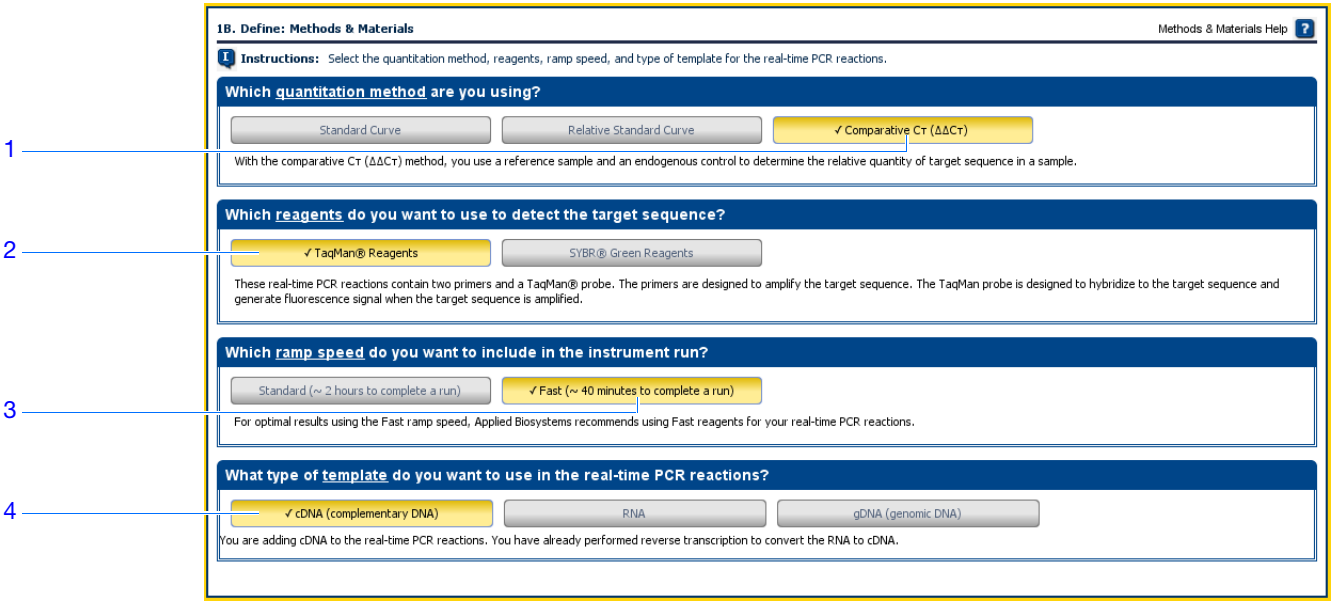
En el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- Se utiliza el método de cuantificación de C_T comparativos.
- Se utilizan reactivos TaqMan®.
- Se utiliza la velocidad de rampa rápida en el proceso del instrumento.
- cDNA (preparado a partir de RNA total aislado de hígado, riñón y cerebro) es el tipo de molde. Antes de utilizar el molde cDNA, primero hay que realizar una retrotranscripción para convertir el RNA en cDNA (consulte "Preparación del molde" en la página 157).

Pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales)

1. Seleccione **Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)** (C_T comparativos) como método de cuantificación.
2. Seleccione **ensayos TaqMan®** para los reactivos.
3. Seleccione **Fast (~40 minutes to complete a run)** (Rápido (40 minutos aproximadamente para completar una reacción)) para la velocidad de la rampa.
4. Seleccione **cDNA (complementary DNA)** (cDNA (DNA complementario)) como tipo de molde.
5. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas


1B. Define: Methods & Materials
Methods & Materials Help
Instructions: Select the quantitation method, reagents, ramp speed, and type of template for the real-time PCR reactions.
Which quantitation method are you using?
Standard Curve
Relative Standard Curve
✓ Comparative CT (ΔΔCT)
With the comparative CT (ΔΔCT) method, you use a reference sample and an endogenous control to determine the relative quantity of target sequence in a sample.
Which reagents do you want to use to detect the target sequence?
✓ TaqMan® Reagents
SYBR® Green Reagents
These real-time PCR reactions contain two primers and a TaqMan® probe. The primers are designed to amplify the target sequence. The TaqMan probe is designed to hybridize to the target sequence and generate fluorescence signal when the target sequence is amplified.
Which ramp speed do you want to include in the instrument run?
Standard (~ 2 hours to complete a run)
✓ Fast (~ 40 minutes to complete a run)
For optimal results using the Fast ramp speed, Applied Biosystems recommends using Fast reagents for your real-time PCR reactions.
What type of template do you want to use in the real-time PCR reactions?
✓ cDNA (complementary DNA)
RNA
gDNA (genomic DNA)
You are adding cDNA to the real-time PCR reactions. You have already performed reverse transcription to convert the RNA to cDNA.
1
2
3
4

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Seleccione **Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)** (C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) como método de cuantificación. Los experimentos de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) determinan el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen diana en una muestra de referencia. Para obtener los resultados, se utilizan fórmulas aritméticas. Para configurar la placa de reacción, el método de C_T comparativos requiere dianas, muestras, una muestra de referencia y un control endógeno.

  Nota: Antes de utilizar el método de C_T comparativos, Applied Biosystems recomienda determinar si las eficiencias de PCR del ensayo diana y el ensayo de control endógeno son aproximadamente iguales. Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays y Custom TaqMan® Gene Expression Assays tienen unas eficiencias de amplificación equivalentes del 100% (±10%).

- Seleccione los reactivos que desea utilizar:
  - Seleccione **ensayos TaqMan®** si desea utilizar estos reactivos para detectar la amplificación y cuantificar la cantidad de gen diana en las muestras. Los reactivos TaqMan se componen de dos cebadores y una sonda TaqMan®. Los cebadores están diseñados para amplificar el gen diana. La sonda TaqMan está diseñada para hibridar en el gen diana y generar una señal de fluorescencia cuando se amplifica el gen diana.

    ¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador ni apantallador con el sistema StepOne™.

  - Seleccione **reactivos SYBR® Green** si desea utilizar estos reactivos para detectar la amplificación y cuantificar la cantidad de gen diana en las muestras. Los reactivos SYBR Green se componen de dos cebadores y un fluorocromo SYBR Green. Los cebadores están diseñados para amplificar el gen diana. El

Notas

fluorocromo SYBR Green genera una señal de fluorescencia cuando se une a DNA de doble cadena. El fluorocromo SYBR Green suele formar parte de la mezcla maestra SYBR Green que se añade a la reacción. Si utiliza un fluorocromo SYBR Green:

Active la casilla de verificación **Include Melt Curve** (Incluir curva de disociación) para realizar un análisis de curva de disociación de el gen diana amplificado.

Seleccione **Standard** (Estándar) para la velocidad de la rampa. Applied Biosystems no dispone de una mezcla maestra rápida para reactivos SYBR Green.

Nota: Se pueden utilizar otros reactivos basados en fluorescencia en el sistema StepOne; sin embargo, debe diseñar su experimento con el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) en lugar con el asistente de diseño. Consulte "Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)" en la página 206.

- Seleccione la velocidad de rampa apropiada para el proceso del instrumento:
  - Seleccione **Fast (~40 Minutes to Complete a Run)** (Rápido (aproximadamente 40 minutos para completar una reacción)) si utiliza reactivos tipo rápido para las reacciones de PCR.
  - Seleccione **Standard (~2 Hours to Complete a Run)** (Estándar (aproximadamente 2 horas para completar una reacción)) si utiliza reactivos estándar para las reacciones de PCR (incluidos reactivos SYBR Green y reactivos TaqMan estándar).
- Seleccione el molde de PCR apropiado:
  - Seleccione **cDNA (complementary DNA)** (cDNA (DNA complementario)) si va a realizar una RT-PCR de 2 pasos y ya ha realizado la retrotranscripción para convertir el RNA en cDNA. Se añade DNA complementario a las reacciones de PCR.
  - Seleccione **RNA** si va a realizar una RT-PCR de 1 paso. Se añade el RNA o mRNA total a las reacciones de PCR.
  - Seleccione **gDNA (genomic DNA)** (gDNA (DNA genómico)) si ya ha extraído el gDNA de un tejido o una muestra. Se añade DNA genómico purificado a las reacciones de PCR.

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- La determinación de las eficiencias de PCR, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**. En la ayuda, realice la búsqueda de la siguiente manera:
  a. Haga clic en la ficha **Search** (Buscar).
  b. Escriba **PCR efficiency** (Eficiencia de PCR).
  c. Haga clic en **List Topics** (Ver temas).
  d. Haga doble clic en **Determine PCR Efficiency** (Determinar la eficiencia de la PCR).
- Si utiliza el método de cuantificación de curva estándar relativa, consulte los capítulos 2 - 5 de esta guía.
- El uso del método de cuantificación de curva estándar, consulte la *Guía de introducción a StepOne™ Real-Time PCR System para experimentos de curva estándar*.
- Los reactivos TaqMan y SYBR Green, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.
- La PCR, incluida la PCR en singleplex y en multiplex, y la RT PCR de 1 y de 2 pasos, consulte la *Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Notas

Configuración de los genes diana

En la pantalla Targets (Dianas), escriba el número de genes diana que desea cuantificar en la placa de reacción de PCR y, a continuación, configure el ensayo para cada gen diana.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- Se cuantifican dos dianas en la placa de reacción.
- El ensayo Target 1 (Diana 1) está configurado para el gen diana que se está estudiando. En el experimento de ejemplo, es TP53 (un factor de transcripción que regula otros genes).
- El ensayo Target 2 (Diana 2) se configura para el control endógeno. Para el experimento de ejemplo, se trata de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humano. El GAPDH se utiliza como control endógeno, porque sus niveles de expresión suelen ser relativamente estables.

Pantalla Targets (Dianas)

1. Haga clic en el campo **How many targets do you want to quantify in the reaction plate?** (¿Cuántas dianas desea cuantificar en la placa de reacción?) y, a continuación, escriba **2**.

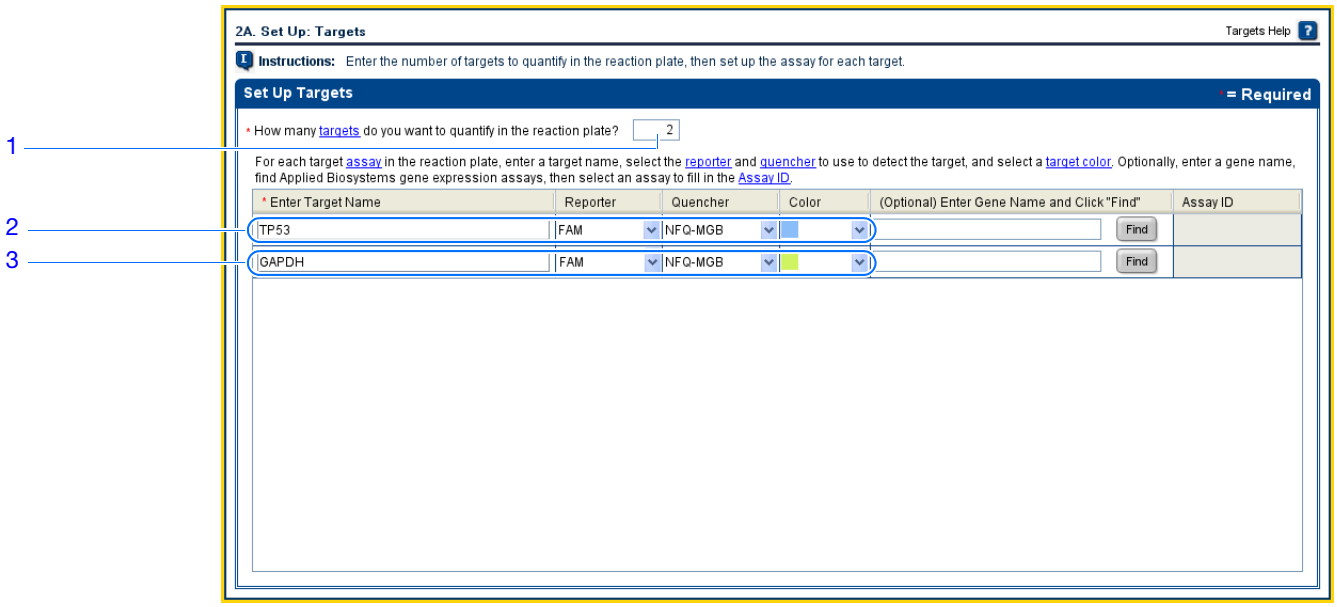
   Nota: El número de filas de la tabla de ensayos diana se actualiza con el número que escriba.

2. Configure el ensayo Target 1 (Diana 1):
   a. Haga clic en la celda **Enter Target Name** (Escribir nombre de gen diana) y, a continuación, escriba **TP53**.
   b. En el menú desplegable Reporter (Notificador), seleccione **FAM** (predeterminado).
   c. En el menú desplegable Quencher (Apantallador), seleccione **NFQ-MGB** (predeterminado).
   d. Deje la opción predeterminada en el campo Color.
3. Configure el ensayo Target 2 (Diana 2):
   a. Haga clic en la celda **Enter Target Name** (Escribir nombre de gen diana) y, a continuación, escriba **GAPDH**.
   b. En el menú desplegable Reporter (Notificador), seleccione **FAM** (predeterminado).
   c. En el menú desplegable Quencher (Apantallador), seleccione **NFQ-MGB** (predeterminado).
   d. Deje la opción predeterminada en el campo Color.

Notas

4. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Nota: En todos los genes diana, deje en blanco el campo (Optional) Enter Gene Name ((Opcional) Escriba el nombre del gen). Puede buscar el identificador del gen/ensayo para solicitar los materiales (consulte "Solicitud de materiales para el experimento" en la página 148).


1
2
3
2A. Set Up: Targets
Targets Help
Instructions: Enter the number of targets to quantify in the reaction plate, then set up the assay for each target.
Set Up Targets
* = Required
* How many targets do you want to quantify in the reaction plate? 2
For each target assay in the reaction plate, enter a target name, select the reporter and quencher to use to detect the target, and select a target color. Optionally, enter a gene name, find Applied Biosystems gene expression assays, then select an assay to fill in the Assay ID.
* Enter Target Name
Reporter
Quencher
Color
(Optional) Enter Gene Name and Click "Find"
Assay ID
TP53
FAM
NFQ-MGB
Find
GAPDH
FAM
NFQ-MGB
Find

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Identifique cada ensayo diana con un nombre y un color únicos. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Target Name (Nombre de gen diana).
- Seleccione un control endógeno para cada muestra. El control endógeno es un gen diana que está presente en todas las muestras que se están investigando. Se debería expresar por igual en todos los tipos de muestras, con independencia del tratamiento o el origen del tejido (ejemplos de controles endógenos: β-actina, GAPDH y RNA ribosomal 18S [rRNA 18S]). El control endógeno se utiliza para normalizar los resultados de la PCR; el control endógeno corrige la cantidad de molde, la eficiencia de extracción del ácido nucleico, la eficiencia de la retrotranscripción y los errores de calibración de las pipetas. Tenga en cuenta que:
  - Cada tipo de muestra (por ejemplo, cada tejido de un estudio en el que se comparan múltiples tejidos) requiere un control endógeno.
  - Si las muestras están distribuidas en múltiples placas, cada placa debe tener un control endógeno. Asimismo, cada placa debe incluir un control endógeno para cada tipo de muestra de la placa.
- Seleccione el fluorocromo del notificador utilizado en el ensayo diana:
  - Seleccione **FAM** si el fluorocromo FAM™ está unido al extremo de 5′ de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.

Notas

  - Seleccione **JOE** si el fluorocromo JOE™ está unido al extremo de 5′ de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.
  - Seleccione **VIC** si el fluorocromo VIC® está unido al extremo de 5′ de la sonda TaqMan que se utiliza para detectar el gen diana.
  - Seleccione **SYBR** si utiliza fluorocromo SYBR® Green para detectar DNA de doble cadena.
- Seleccione el apantallador utilizado en el ensayo diana:
  - Seleccione **NFQ-MGB** si a la sonda TaqMan de 3′ que está utilizando para detectar el gen diana hay unido un apantallador no fluorescente de unión al surco menor de la doble cadena de DNA.
  - Seleccione **None** (Ninguno) si se utiliza fluorocromo SYBR Green.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador ni apantallador con el sistema StepOne™.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Targets (Dianas) , acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- La selección de un control endógeno, consulte la nota de aplicación *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies*.

Configuración de las muestras

En la pantalla Samples (Muestras), escriba el número de muestras, réplicas y controles negativos que va a incluir en la placa de reacción, escriba los nombres de las muestras y, a continuación, seleccione las reacciones de muestra/diana que va a configurar.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- Se utilizan tres muestras: cDNA preparado a partir de RNA total aislado de hígado, riñón y cerebro. Las muestras contienen cantidades desconocidas de TP53 (diana) y del gen GAPDH (control endógeno).
- Se utilizan tres réplicas. Las réplicas son reacciones idénticas que contienen componentes y volúmenes idénticos.
- Se utilizan seis controles negativos. Las reacciones de control negativo contienen agua en lugar de la muestra y no se deberían amplificar. El software incluye automáticamente tres controles negativos para cada ensayo diana.

Notas

Pantalla Samples (Muestras)

1. Haga clic en el campo **How many samples do you want to test in the reaction plate?** (Cuántas muestras desea probar en la placa de reacción?) y, a continuación, escriba **3**.

   Nota: El número de filas de la tabla de las muestras se actualiza con el número que escriba.

2. Haga clic en el campo **How many replicates do you need?** (¿Cuántas réplicas necesita?) y, a continuación, escriba **3**.

3. Configure la muestra 1:

   a. Haga clic en el campo **Enter Sample Name** (Escriba nombre de muestra) y, a continuación, escriba **Liver** (Hígado).

   b. Deje la opción predeterminada en el campo Color.

4. Configure la muestra 2:

   a. Haga clic en el campo **Enter Sample Name** (Escriba nombre de muestra) y, a continuación, escriba **Kidney** (Riñón).

   b. Deje la opción predeterminada en el campo Color.

5. Configure la muestra 3:

   a. Haga clic en el campo **Enter Sample Name** (Escriba nombre de muestra) y, a continuación, escriba **Brain** (Cerebro).

   b. Deje la opción predeterminada en el campo Color.

6. Seleccione **All Sample/Target Reactions** (Todas las reacciones de muestra/diana) para configurar todos los genes diana de todas las muestras.

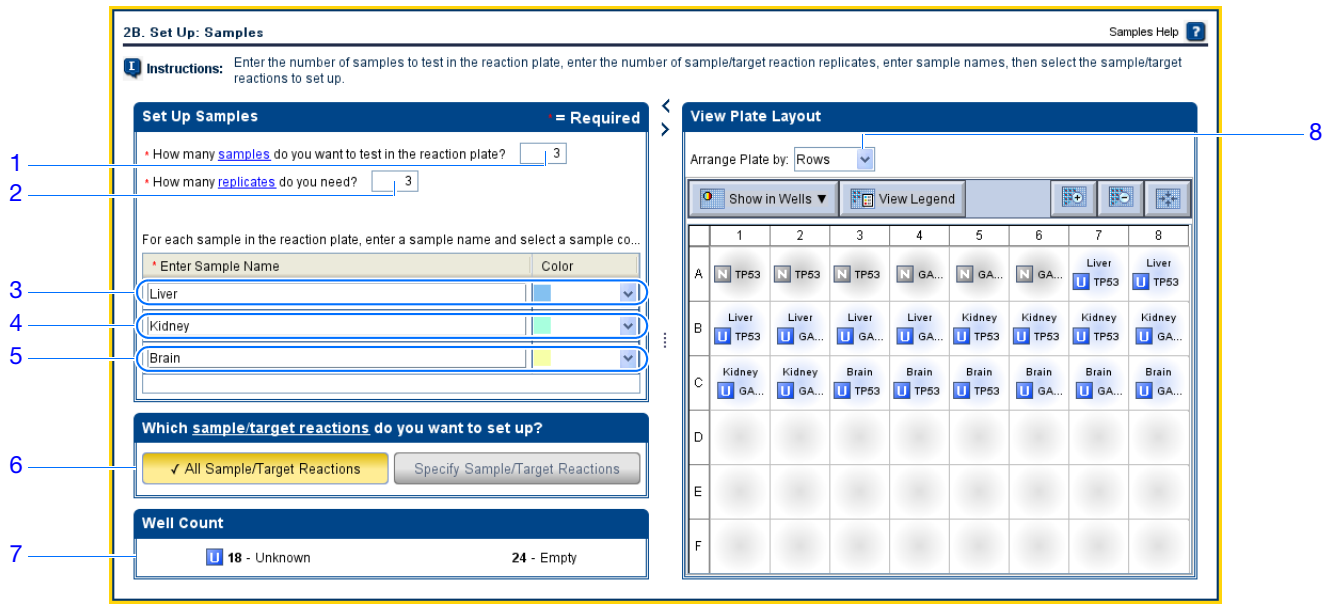
7. En el panel Well Count (Número de pocillos), confirme que hay:
   - 18 pocillos desconocidos U
   - 24 pocillos vacíos

   Nota: El software incluye automáticamente tres controles negativos para cada ensayo diana. Los pocillos de control negativo N se muestran en la disposición de la placa (pocillos A1 a A6).

8. En la ficha View Plate Layout (Ver disposición de la placa), en el menú desplegable Arrange Plate by (Ordenar placa por), seleccione **Rows** (Filas) (predeterminado).

9. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Notas


2B. Set Up: Samples
Samples Help
Instructions: Enter the number of samples to test in the reaction plate, enter the number of sample/target reaction replicates, enter sample names, then select the sample/target reactions to set up.
Set Up Samples
* = Required
* How many samples do you want to test in the reaction plate? 3
* How many replicates do you need? 3
For each sample in the reaction plate, enter a sample name and select a sample co...
* Enter Sample Name
Color
Liver
Kidney
Brain
Which sample/target reactions do you want to set up?
✓ All Sample/Target Reactions
Specify Sample/Target Reactions
Well Count
18 - Unknown
24 - Empty
View Plate Layout
Arrange Plate by: Rows
Show in Wells
View Legend
1
2
3
4
5
6
7
8

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Identifique cada muestra con un nombre y un color únicos. Puede introducir hasta 100 caracteres en el campo Sample Name (Nombre de muestra).
- Escriba el número de reacciones idénticas (réplicas) que desea configurar. Applied Biosystems recomienda tres réplicas para cada reacción de muestra.
- El software incluye automáticamente tres controles negativos para cada ensayo diana.
- Seleccione la combinación de reacciones de muestra/diana deseada:
  - Seleccione **All Sample/Target Reactions** (Todas las reacciones de muestra/diana) para configurar todos los genes diana de todas las muestras.
  - Seleccione **Specify Sample/Target Reactions** (Especifique reacciones de muestra/diana) para configurar de uno en uno los genes diana que se van a amplificar en cada muestra.

Nota: En el asistente de diseño, cada reacción de PCR sólo puede contener una muestra y un ensayo diana.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Samples (Muestras), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Configuración de las opciones de cuantificación relativa

En la pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa), seleccione la muestra de referencia y el control endógeno para realizar la cuantificación relativa.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- El tejido de cerebro se utiliza como muestra de referencia.
- GAPDH se utiliza como control endógeno.

Pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa)

1. En el menú desplegable Which sample do you want to use as the reference sample? (¿Qué muestra desea utilizar como muestra de referencia?), seleccione **Brain** (cerebro).
2. En el menú desplegable Which target do you want to use as the endogenous control? (¿Qué diana desea utilizar como control endógeno?), seleccione **GAPDH**.
3. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

2C. Set Up: Relative Quantitation Settings
Relative Quantitation Settings Help
Instructions: Select the reference sample and the endogenous control to perform relative quantitation.
1
Which sample do you want to use as the reference sample?
Brain
2
Which target do you want to use as the endogenous control?
GAPDH

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Seleccione una muestra de referencia entre las muestras creadas anteriormente ("Configuración de las muestras" en la página 137). Los resultados de la amplificación de las muestras se comparan con los resultados de la amplificación de la muestra de referencia para determinar la expresión relativa.
- Seleccione un control endógeno en los ensayos diana creados previamente ("Configuración de los genes diana" en la página 135). Los resultados de la amplificación del control endógeno se utilizan para normalizar los resultados de la amplificación del gen diana para corregir las diferencias en la cantidad de molde añadido a cada reacción.

Notas

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Relative Quantitation Settings (Opciones de cuantificación relativa), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- Las muestras de referencia (también denominadas calibradores) y los controles endógenos, consulte *User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression*.

Configuración del protocolo de termociclado

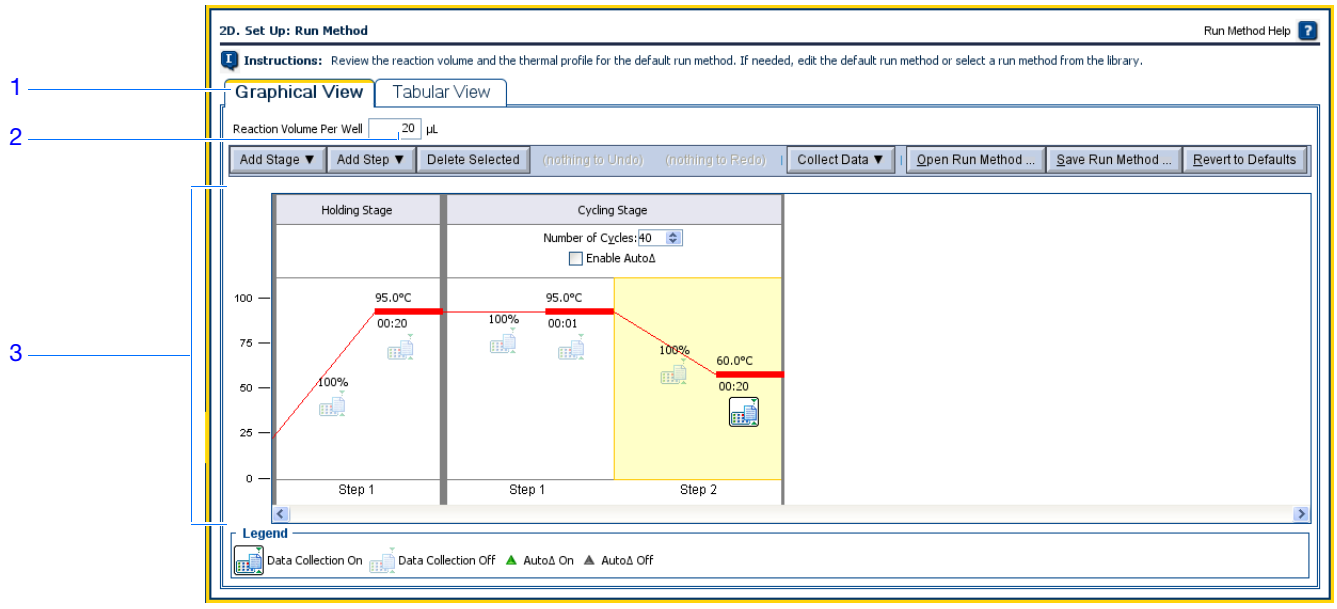
En la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado), revise el volumen de la reacción y el perfil térmico del protocolo de termociclado predeterminado. Si es necesario, puede editar el protocolo de termociclado predeterminado o sustituirlo por otro de la biblioteca Run Method (Protocolo de termociclado).

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, se utiliza el protocolo de termociclado predeterminado sin modificaciones.

Revisión de la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado)

1. Haga clic en la ficha **Graphical View** (Vista gráfica) (predeterminada) o **Tabular View** (Vista tabular).
2. Asegúrese de que en el campo Reaction Volume Per Well (Volumen de reacción por pocillo) aparece **20 µL**.
3. Asegúrese de que en el perfil térmico aparecen las etapas y los ciclos que se indican a continuación.
4. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.



Notas

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Escriba un número entre 10 y 30 para el volumen de reacción/pocillo. El sistema StepOne admite volúmenes de reacción de entre 10 y 30 µL.
- Revise el perfil térmico:
  - Asegúrese de que el perfil térmico es apropiado para los reactivos.
  - Si va a realizar una RT-PCR de 1 paso, incluya un paso de retrotranscripción.

  Si el experimento necesita un perfil térmico diferente, modifique el perfil térmico o cambie el protocolo de termociclado por otro de la biblioteca Run Method (Protocolo de termociclado). La biblioteca Run Method (Protocolo de termociclado) está incluida en el software StepOne.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la biblioteca Run Method (Protocolo de termociclado) o acerca de la pantalla Run Method (Protocolo de termociclado), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Revisión de la configuración de la reacción

En la pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción), seleccione el tipo de ensayo (si utiliza reactivos TaqMan) y, a continuación, revise los volúmenes calculados para preparar las reacciones de PCR y las diluciones de las muestras. Si es necesario, puede editar el volumen de reacción, el volumen de reacción de exceso, las concentraciones de los reactivos y/o la concentración de las muestras.

¡IMPORTANTE! Realice estos pasos para cada ensayo diana de la placa de reacción.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- Se utilizan Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays.
- El volumen de reacción por pocillo es 20 µL.
- El volumen de reacción de exceso es del 10%.
- Los componentes de la reacción son:
  - TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2✕)
  - Ensayo de TP53 (20✕)
  - Ensayo de GAPDH (20✕)
  - Muestra
  - Agua
- La concentración de la muestra diluida es de 5,0 ng/µL.
- La concentración de la solución de partida de la muestra es de 100 ng/µL.

Notas

Pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción)

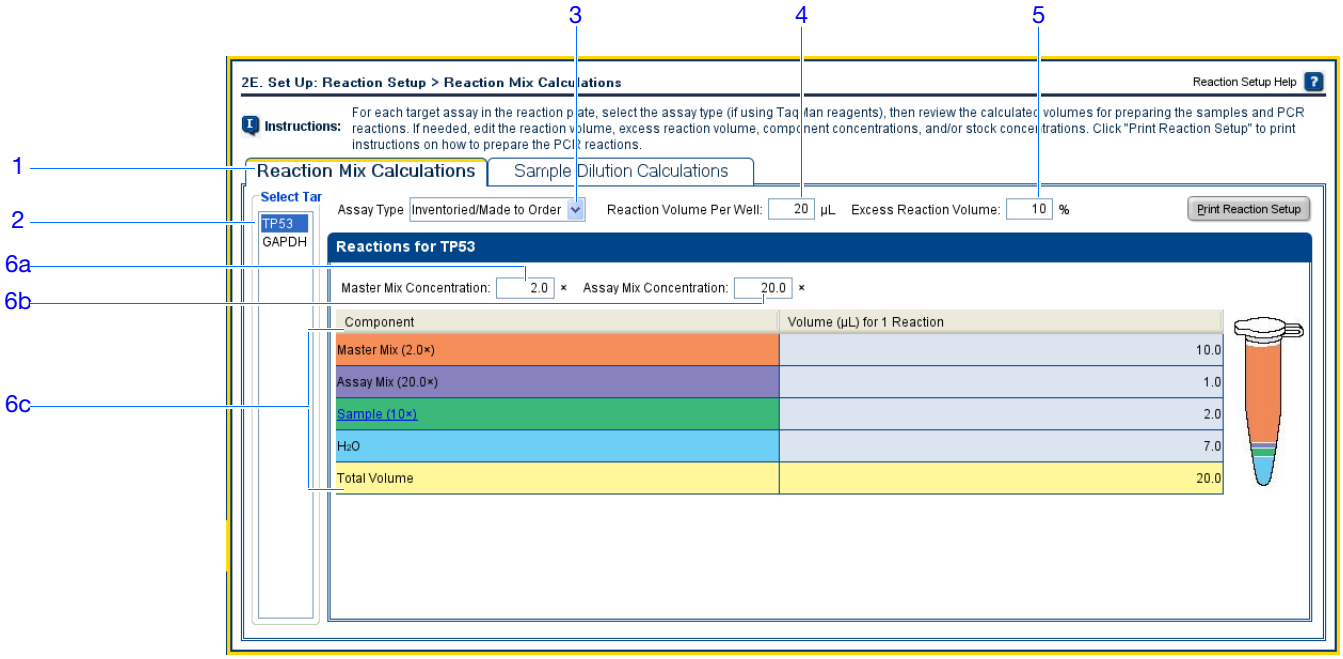
Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de TP53

1. Seleccione la ficha **Reaction Mix Calculations** (Cálculos de la mezcla de reacción) (predeterminada).
2. En el panel Select Target (Seleccionar diana), seleccione **TP53**.
3. En el menú desplegable Assay Type (Tipo de ensayo), seleccione **Inventoried/Made to Order** (En inventario/Fabricado bajo pedido).
4. Asegúrese de que en el campo Reaction Volume Per Well (Volumen de reacción por pocillo) aparece **20 µL**.
5. Asegúrese de que en el campo Excess Reaction Volume (Volumen de reacción en exceso) muestra **10%**.
6. En el panel Reactions for TP53 (Reacciones para TP53):
   a. Asegúrese de que en el campo Master Mix Concentration (Concentración de mezcla maestra) aparece **2X**.
   b. Asegúrese de que en el campo Assay Mix Concentration (Concentración de ensayo) aparece **20X**.
   c. Revise los componentes y los volúmenes calculados para las reacciones de PCR:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción
Mezcla maestra (2X)	10,0
Ensayo (20X)	1,0
Muestra (10X)	2,0‡
H_2O	7,0
Volumen total	20,0

‡ El volumen de la muestra se limita al 10% del volumen total de la reacción.

Notas



Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de GAPDH

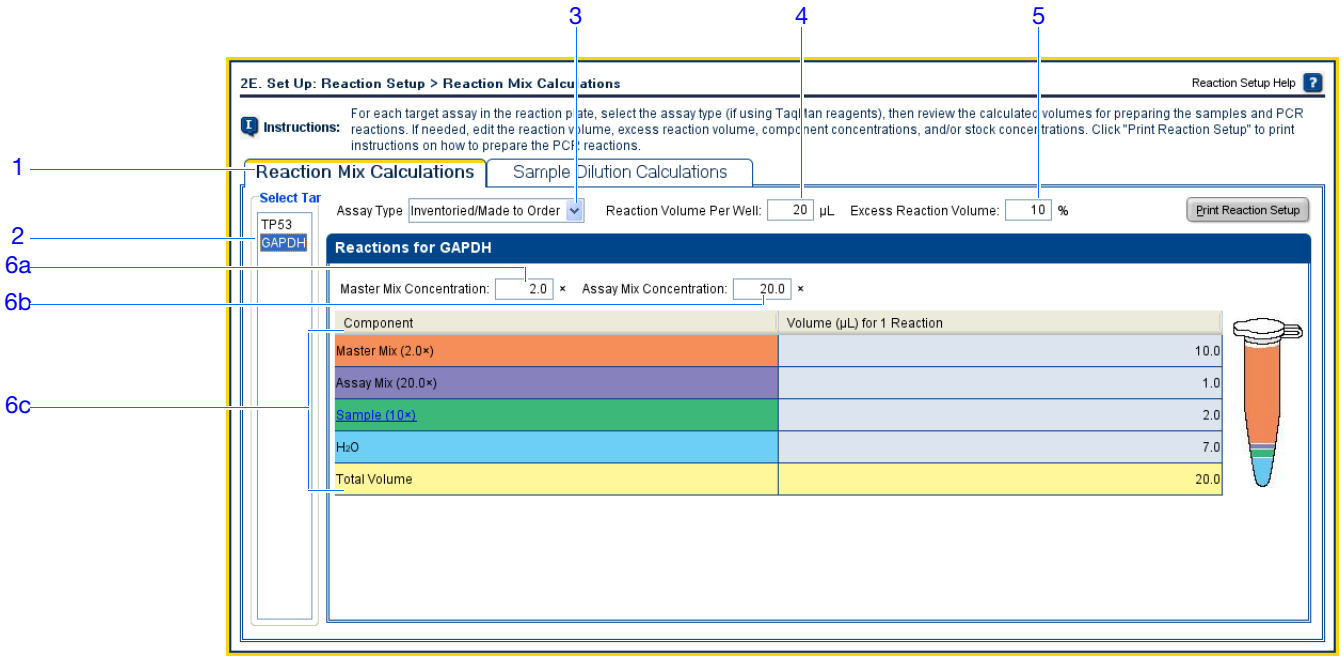
1. Seleccione la ficha **Reaction Mix Calculations** (Cálculos de la mezcla de reacción) (predeterminada).
2. En el panel Select Target (Seleccionar diana), seleccione **GAPDH**.
3. En el menú desplegable Assay Type (Tipo de ensayo), seleccione **Inventoried/Made to Order** (En inventario/Fabricado bajo pedido).
4. Asegúrese de que en el campo Reaction Volume Per Well (Volumen de reacción por pocillo) aparece **20 µL**.
5. Asegúrese de que en el campo Excess Reaction Volume (Volumen de reacción en exceso) muestra **10%**.
6. En el panel Reactions for GAPDH (Reacciones para GAPDH):
   a. Asegúrese de que en el campo Master Mix Concentration (Concentración de mezcla maestra) aparece **2×**.
   b. Asegúrese de que en el campo Assay Mix Concentration (Concentración de ensayo) aparece **20×**.

Notas

c. Revise los componentes y los volúmenes calculados para las reacciones de PCR:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción
Mezcla maestra (2X)	10,0
Ensayo (20X)	1,0
Muestra (10X)	2,0‡
H_2O	7,0
Volumen total	20,0

‡ El volumen de la muestra se limita al 10% del volumen total de la reacción.



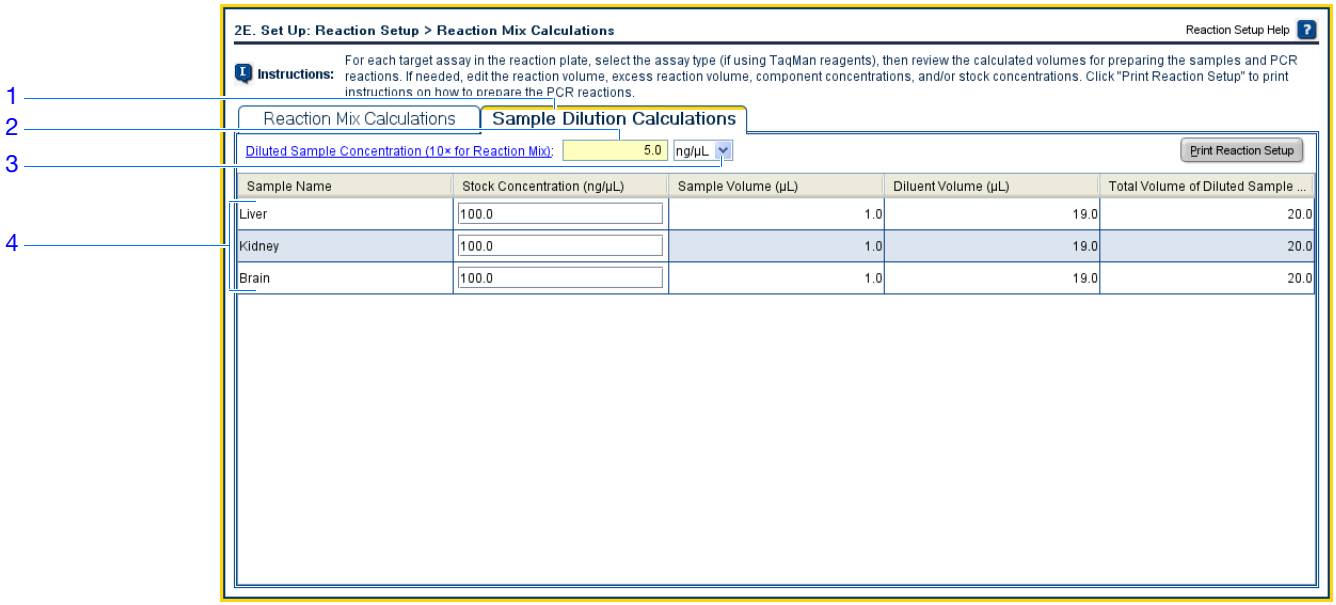
Complete la ficha Sample Dilution Calculations (Cálculos de la dilución de muestra)

1. Seleccione la ficha **Sample Mix Calculations** (Cálculos de la mezcla de muestra).
2. Haga clic en el campo **Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix)** (Concentración de muestra diluida (10X para la mezcla de reacción)) y, a continuación, escriba **5,0**.
3. En el menú desplegable de la unidad, seleccione **ng/µL** (predeterminado).

Notas

4. Revise los volúmenes calculados para las diluciones de las muestras:

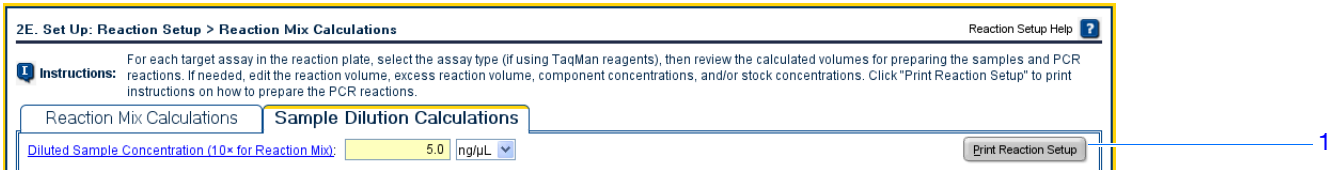
Nombre de la muestra	Concentración de la solución origen (ng/µL)	Volumen de muestra (µL)	Volumen de disolvente (µL)	Volumen total de muestra diluida (µL)
Hígado	100,0	1,0	19,0	20,0
Riñón	100,0	1,0	19,0	20,0
Cerebro	100,0	1,0	19,0	20,0



Imprima las instrucciones de la configuración de la reacción

Imprima las instrucciones detalladas de la configuración de la reacción y, a continuación, guárdelas para el Capítulo 7, "Preparación de las reacciones de C_T comparativos."

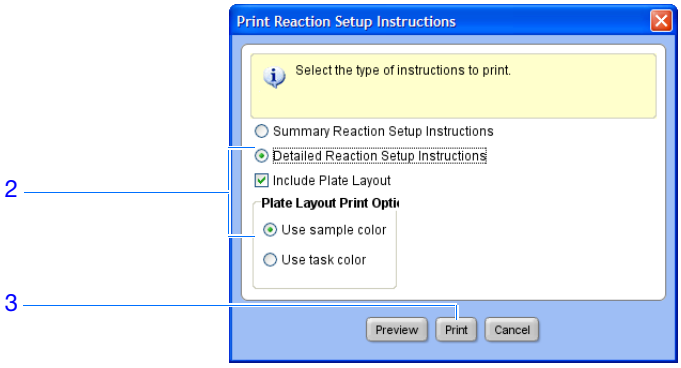
1. Haga clic en **Print Reaction Setup** (Imprimir configuración de reacción).


2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations
Reaction Setup Help
Instructions:
For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the samples and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.
Reaction Mix Calculations
Sample Dilution Calculations
Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix):
5.0
ng/µL
Print Reaction Setup
1

2. En el cuadro de diálogo, seleccione:
   - **Detailed Reaction Setup Instructions** (Instrucciones detalladas de la configuración de la reacción)
   - **Include Plate Layout** (Incluir disposición de la placa)
   - **Use sample color** (Utilizar color de muestra)

Notas

3. Haga clic en **Print** (Imprimir).



4. En el cuadro de diálogo Print (Imprimir), seleccione la impresora y las opciones de impresión y, a continuación, haga clic en **OK** (Aceptar).

5. Haga clic en **Next** (Siguiente) >.

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Si utiliza reactivos TaqMan, seleccione el tipo de ensayo que va a utilizar:
  - Seleccione **Inventoried/Made to Order** (En inventario/Fabricado bajo pedido) si utiliza Applied Biosystems TaqMan®Gene Expression Assays (en inventario o fabricados bajo pedido) o Applied Biosystems Custom TaqMan®Gene Expression Assays.
  - Seleccione **Custom** (Personalizado) si va a diseñar sus propios ensayos con el software Primer Express®.
- Escriba un número entre 10 y 30 para el volumen de reacción/pocillo. El sistema StepOne admite volúmenes de reacción de entre 10 y 30 µL.
- Incluya el volumen de reacción en exceso para contabilizar la pérdida que se produce durante el pipeteo. Applied Biosystems recomienda un volumen de reacción en exceso de al menos el 10%.
- Revise las concentraciones de la mezcla de reacción para cada gen diana: Si es necesario:
  - Para los reactivos TaqMan, modifique las concentraciones de la mezcla maestra y el ensayo.
  - Para los reactivos SYBR Green, modifique las concentraciones de la mezcla maestra, el cebador directo y el cebador reverso.
  - Para la RT-PCR de 1 paso, modifique la concentración de retrotranscripción.
- Revise los componentes de la mezcla de reacción para cada gen diana:
  - Si va a trabajar de modo rápido, asegúrese de utilizar una mezcla maestra rápida en las reacciones de PCR.
  - Si va a realizar reacciones de PCR en modo estándar, asegúrese de utilizar una mezcla maestra tipo estándar en las reacciones de PCR.
  - En la RT-PCR de 1 paso, asegúrese de incluir retrotranscriptasa en las reacciones de PCR y de utilizar un tampón específico.

Notas

- Revise los cálculos de la dilución de las muestras para cada muestra. Si es necesario, modifique la concentración de muestra diluida (incluidas las unidades) y la concentración de la solución de partida.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.
- Para los ensayos de Applied Biosystems, refiérase a:
  - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Solicitud de materiales para el experimento

En la pantalla Materials List (Lista de materiales), revise la lista de materiales que se recomiendan para preparar para la placa de reacción de PCR.

Opcionalmente, puede solicitar los materiales recomendados a la tienda en línea de Applied Biosystems. Cree una cesta de la compra, añada productos a la cesta de compra y, a continuación, inicie la sesión para enviar su pedido. Para acceder a la tienda en línea de Applied Biosystems, debe tener una conexión a Internet ilimitada.

Nota: El software StepOne recomienda los materiales que debe solicitar de acuerdo con el diseño del experimento. Se da por hecho que se va a diseñar el experimento, solicitar los materiales y luego preparar (Capítulo 7) y procesar (Capítulo 8) la placa de reacción cuando reciba los materiales.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, los materiales recomendados son:

- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG
- Ensayo de TP53: Hs00153340_m1 (RefSeq NM_000546.2)
- Ensayo de GAPDH: Kit de control endógeno de GAPDH (GAPDH) humano (PN 4333764T)

Pantalla Ordering Materials (Solicitud de materiales)

1. Busque el ensayo diana en la tienda en línea de Applied Biosystems:
   a. Asegúrese de que el ordenador está conectado a Internet.
   b. Haga clic en el campo **Enter Gene Name** (Escriba el nombre del gen), escriba **TP53** y, a continuación, haga clic en **Find Assay** (Buscar ensayo).
   c. En el cuadro de diálogo Find Assay Results (Buscar resultados de ensayo), seleccione la fila **Hs00153340_m1**.
   d. Haga clic en el campo **Enter Gene Name** (Escriba el nombre del gen), escriba **GAPDH** y, a continuación, haga clic en **Find Assay** (Buscar ensayo).

Notas

e. En el cuadro de diálogo Find Assay Results (Buscar resultados de ensayo), seleccione la fila **4333764T**.

f. Haga clic en **Apply Assay Selection** (Aplicar selección de ensayo).

2. Complete el panel Experiment Materials List (Lista de materiales del experimento):

a. En el menú desplegable Display (Visualización), seleccione **All Items** (Todos los elementos) (predeterminada) y, a continuación, revise los materiales recomendados. Si es necesario, utilice la barra de desplazamiento situada a la derecha para ver todos los elementos.

b. Active la casilla de verificación junto a cada uno de los siguientes elementos:

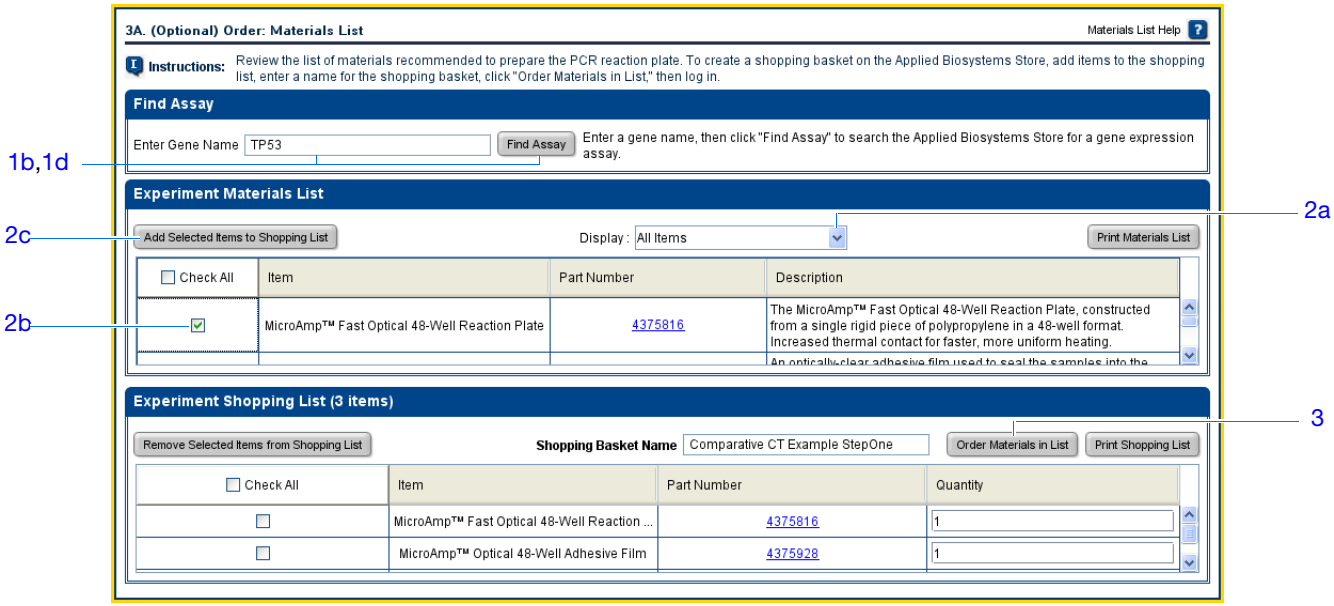
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2✕), No AmpErase® UNG
- Ensayo de TP53: Hs00153340_m1 (RefSeq NM_000546.2)
- Ensayo de GAPDH: Kit de control endógeno de GAPDH (GAPDH) humano (PN 4333764T)

Nota: Para obtener más información acerca de un elemento específico, haga clic en el vínculo del número de referencia para conectarse a la tienda en línea de Applied Biosystems. En la página de inicio, escriba el número de referencia en el campo Search (Búsqueda) y, a continuación, haga clic en **Go** (Ir).

c. Haga clic en **Add Selected Items to Shopping List** (Añadir elementos seleccionados a la cesta de compra).

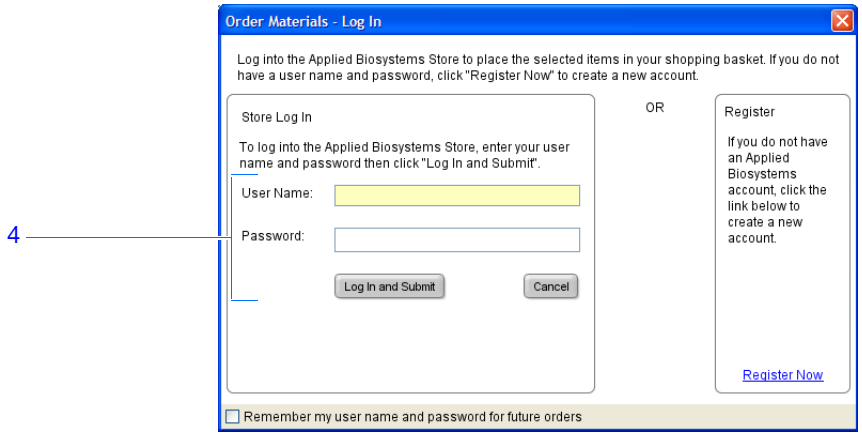
3. Compruebe si la cesta de compra del experimento contiene los materiales deseados y que las cantidades son correctas y, a continuación, haga clic en **Order Materials in List** (Solicitar materiales de la lista).

Notas


3A. (Optional) Order: Materials List
Materials List Help
Instructions: Review the list of materials recommended to prepare the PCR reaction plate. To create a shopping basket on the Applied Biosystems Store, add items to the shopping list, enter a name for the shopping basket, click "Order Materials in List," then log in.
Find Assay
Enter Gene Name TP53
Find Assay
Enter a gene name, then click "Find Assay" to search the Applied Biosystems Store for a gene expression assay.
Experiment Materials List
Add Selected Items to Shopping List
Display : All Items
Print Materials List
Check All
Item
Part Number
Description
MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
4375816
The MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, constructed from a single rigid piece of polypropylene in a 48-well format. Increased thermal contact for faster, more uniform heating.
Experiment Shopping List (3 items)
Remove Selected Items from Shopping List
Shopping Basket Name
Comparative CT Example StepOne
Order Materials in List
Print Shopping List
Check All
Item
Part Number
Quantity
MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction ...
4375816
1
MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
4375928
1
1b,1d
2c
2b
2a
3

4. En el cuadro de diálogo, Order Materials - Log In (Solicitar materiales – Inicio de sesión), escriba el nombre de usuario y la contraseña de la tienda en línea de Applied Biosystems y, a continuación, haga clic en **Login and Submit** (Iniciar la sesión y enviar).

Nota: Si no tiene cuenta en la tienda en línea de Applied Biosystems, haga clic en **Register Now** (Registrarse ahora) para crear una cuenta.


Order Materials - Log In
Log into the Applied Biosystems Store to place the selected items in your shopping basket. If you do not have a user name and password, click "Register Now" to create a new account.
Store Log In
To log into the Applied Biosystems Store, enter your user name and password then click "Log In and Submit".
User Name:
Password:
Log In and Submit
Cancel
OR
Register
If you do not have an Applied Biosystems account, click the link below to create a new account.
Register Now
Remember my user name and password for future orders
4

5. Después de realizar el pedido, haga clic en **Finish Designing Experiment** (Finalizar el diseño del experimento).

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- Confirme que el ordenador tiene una conexión a Internet ilimitada.

Notas

- Applied Biosystems recomienda las siguientes versiones de navegadores y Adobe® Acrobat® Reader para utilizar el sitio web de Applied Biosystems:

Sistema operativo del pc de escritorio	Netscape® Navigator	Microsoft® Internet Explorer	Adobe® Acrobat® Reader
Windows® 98/NT/2000	v6.x o posterior	v6.x o posterior	v4.0 o posterior
Macintosh® OS 9 o posterior	v6.x o posterior	v5.2 o posterior	v4.0 o posterior

Nota: Asegúrese de que se han activado las cookies y Java Script para que el sitio web funcione correctamente.

- Seleccione todos los materiales que necesite para el experimento y añádalos a la cesta de compra.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Materials List (Lista de materiales), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

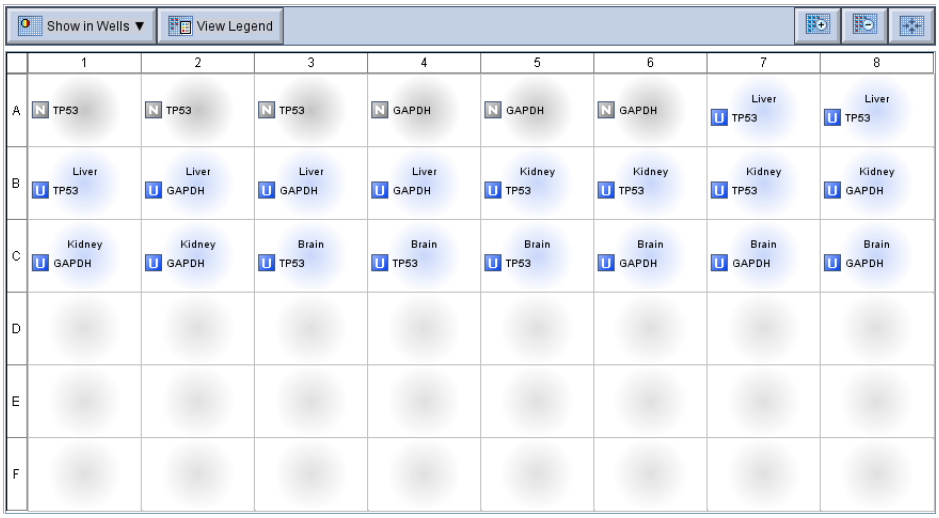
Finalización del flujo de trabajo del asistente de diseño

Para finalizar el flujo de trabajo del asistente de diseño, revise la disposición de la placa y, a continuación, seleccione una opción de salida.

Acerca del experimento de ejemplo

El software StepOne selecciona automáticamente ubicaciones para los pocillos en la placa de reacción. En el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- Los pocillos se colocan tal y como se muestra a continuación.


Show in Wells
View Legend
1 2 3 4 5 6 7 8
A N TP53 | N TP53 | N TP53 | N GAPDH | N GAPDH | N GAPDH | Liver U TP53 | Liver U TP53
B Liver U TP53 | Liver U GAPDH | Liver U GAPDH | Liver U GAPDH | Kidney U TP53 | Kidney U TP53 | Kidney U TP53 | Kidney U GAPDH
C Kidney U GAPDH | Kidney U GAPDH | Brain U TP53 | Brain U TP53 | Brain U TP53 | Brain U GAPDH | Brain U GAPDH | Brain U GAPDH
D
E
F

- El experimento se guarda tal y como está y se cierra.

Nota: Para el experimento de ejemplo, no realice el proceso en este momento.

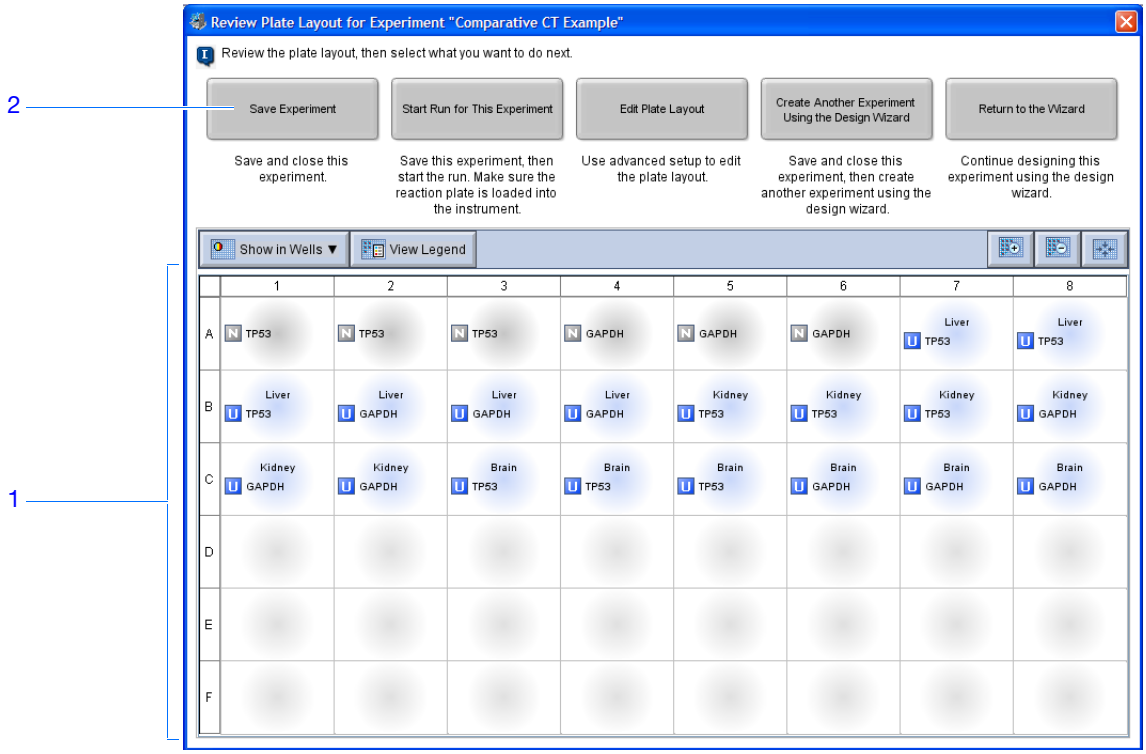
Finalización del asistente de diseño

1. En la ventana Review Plate for Experiment (Revisar placa para el experimento), revise la disposición de la placa. Asegúrese de que hay:
   - 18 pocillos desconocidos U
   - 6 pocillos de control negativo N
   - 24 pocillos vacíos

   Nota: Si la disposición de la placa es incorrecta, haga clic en **Return to the Wizard** (Volver al asistente) y compruebe los valores que ha introducido.

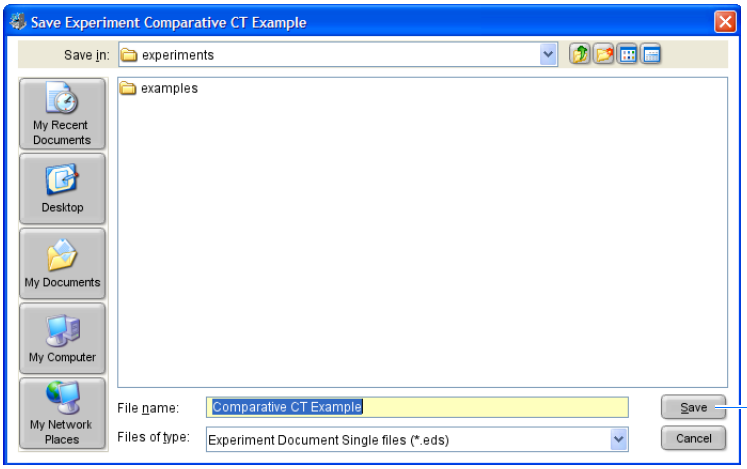
2. Haga clic en **Save Experiment** (Guardar experimento).

Notas


Review Plate Layout for Experiment "Comparative CT Example"
Review the plate layout, then select what you want to do next.
Save Experiment
Start Run for This Experiment
Edit Plate Layout
Create Another Experiment Using the Design Wizard
Return to the Wizard
Save and close this experiment.
Save this experiment, then start the run. Make sure the reaction plate is loaded into the instrument.
Use advanced setup to edit the plate layout.
Save and close this experiment, then create another experiment using the design wizard.
Continue designing this experiment using the design wizard.
Show in Wells
View Legend
2
1

3. En el cuadro de diálogo Save Experiment (Guardar experimento), haga clic en **Save** (Guardar) para aceptar la ubicación y el nombre de archivo predeterminados. El experimento de ejemplo se guarda y se cierra, y regresa a la pantalla de inicio.

Nota: De manera predeterminada, el experimento de ejemplo se guarda en la carpeta Applied Biosystems\StepOne System\experiments.



Notas

Directrices de diseño

Cuando diseñe su propio experimento de C_T comparativos:

- En la ventana Review Plate for Experiment (Revisar placa para el experimento), seleccione la opción de salida apropiada:
  - Haga clic en **Save Experiment** (Guardar experimento) si desea guardar y cerrar el experimento sin realizar ningún otro cambio ni iniciar el proceso.
  - Haga clic en **Start Run for This Experiment** (Iniciar proceso para este experimento) si desea guardar el experimento e iniciar el proceso. Asegúrese de que la placa de reacción está cargada en el instrumento.
  - Haga clic en **Edit Plate Layout** (Editar disposición de placa) si desea utilizar el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) para modificar la disposición de la placa.
  - Haga clic en **Create Another Experiment Using the Design Wizard** (Crear otro experimento con el asistente de diseño) si desea guardar y cerrar el experimento y, a continuación, crear otro experimento con el asistente de diseño.
  - Haga clic en **Return to the Wizard** (Regresar al asistente) si desea regresar al experimento para realizar cambios con el asistente de diseño.
- De manera predeterminada, los experimentos se guardan en la carpeta Applied Biosystems\StepOne System\experiments. Para cambiar:
  - La ubicación en la que se guarda un experimento específico, desplácese a la ubicación deseada con el cuadro de diálogo Save Experiment (Guardar experimento).
  - La ubicación en la que se guardan los experimentos de manera predeterminada, seleccione **Tools** (Herramientas) ▸ **Preferences** (Preferencias) y, a continuación, seleccione la ficha **General** (predeterminada). En el campo Default Data Folder (Carpeta de datos predeterminada), desplácese a la ubicación deseada.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca del uso del flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada), consulte "Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)" en la página 206.

Notas

7 Preparación de las reacciones de C_T comparativos

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Resumen del capítulo 156
- Preparación del molde 157
- Preparación de las diluciones de las muestras 158
- Preparación de la mezcla de reacción 160
- Preparación de la placa de reacción 163

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo preparar las reacciones de PCR para el experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) de ejemplo y se ofrecen directrices para preparar las reacciones de PCR para su propio experimento de C_T comparativos.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para preparar las reacciones de PCR para el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.

Experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$)

Inicio del experimento

▼

Diseño del experimento (Capítulo 6)

▼

Preparación de las reacciones (Capítulo 7)

1. Prepare el molde.
2. Prepare las diluciones de las muestras.
3. Prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana.
4. Prepare la placa de reacción.

▼

Realización del experimento (Capítulo 8)

▼

Análisis del experimento (Capítulo 9)

▼

Fin del experimento

Notas

Preparación del molde

Prepare el molde para las reacciones de PCR con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems recomienda utilizar High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit para realizar una retrotranscripción a partir de RNA total y obtener un conjunto de cDNA. Los TaqMan® Gene Expression Assays se han diseñado utilizando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; no se han probado otros protocolos para los TaqMan Gene Expression Assays.

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de C_T comparativos de ejemplo, el molde para las reacciones de PCR es cDNA sintetizado a partir de las muestras de RNA total utilizando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Materiales necesarios

- RNA aislado total preparado a partir de tejidos de hígado, riñón y cerebro.
- Uno de los Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits:

Kit	Número de referencia
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 reacciones)	4368814
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (1000 reacciones)	4368813
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (200 reacciones)	4374966
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (1000 reacciones)	4374967

Nota: El High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit se llamaba antiguamente High-Capacity cDNA Archive Kit.

Preparación del molde

Utilice el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit para sintetizar cDNA de cadena sencilla a partir de las muestras de RNA total. Siga los procedimientos de *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* para:

1. Preparar la mezcla maestra de la reacción.

   CUIDADO **PELIGRO QUÍMICO. El tampón de reacción 10X** puede causar irritación de los ojos, la piel y las vías respiratorias. Consulte la ficha técnica de seguridad (MSDS) y siga las instrucciones de manipulación indicadas. Use protectores oculares, vestimenta protectora y guantes apropiados.

2. Prepare las reacciones de cDNA.

Notas

3. Realice la retrotranscripción en un termociclador.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$):

- Applied Biosystems recomienda extraer primero el DNA o RNA del tejido o muestra.
- Applied Biosystems recomienda los siguientes moldes:
  - **cDNA (cDNA) complementario:** cDNA sintetizado a partir de las muestras de RNA total utilizando un High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.
  - **RNA:** RNA o mRNA total purificado extraído de un tejido o una muestra.
  - **DNA (gDNA) genómico:** gDNA purificado ya extraído de un tejido o una muestra.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La preparación de moldes de cDNA, consulte *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (PN 4375575). El protocolo no se incluye en los High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. Puede descargarlo desde el sitio web Applied Biosystems Documents on Demand:

  http://docs.appliedbiosystems.com/search.taf
- La preparación de moldes de RNA o gDNA, consulte el protocolo de los reactivos de purificación que haya seleccionado. Para localizar los reactivos de purificación de Applied Biosystems, visite el sitio web de Applied Biosystems:

  http://www.appliedbiosystems.com/

Preparación de las diluciones de las muestras

Realice diluciones de las muestras antes de añadir las muestras a la mezcla de reacción final. Diluya las muestras con los volúmenes que ha calculado el software StepOne™ ("Complete la ficha Sample Dilution Calculations (Cálculos de la dilución de muestra)" en la página 145).

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- Las diluciones de las muestras son necesarias porque el volumen de las muestras se limita al 10% del volumen total de la reacción en el software StepOne. El volumen total de la reacción es de 20 µL/reacción, por lo que el volumen de las muestras es de 2 µL/reacción.
- La concentración de la solución de partida es de 100 ng/µL. Después de diluir la muestra de acuerdo con la tabla Sample Dilutions Calculations (Cálculos de diluciones de las muestras), la muestra tendrá una concentración de 5,0 ng/µL. Esto supone una concentración de 10× cuando se añaden 2 µL al volumen de mezcla de reacción final de 20 µL. Hay una concentración de 1× en la reacción final.

Notas

- Los volúmenes calculados en el software son:

Nombre de la muestra	Concentración de la solución origen (ng/µL)	Volumen de muestra (µL)	Volumen de disolvente (µL)	Volumen total de muestra diluida (µL)
Hígado	100,0	1,0	19,0	20,0
Riñón	100,0	1,0	19,0	20,0
Cerebro	100,0	1,0	19,0	20,0

Materiales necesarios

- Agua para diluir la muestra
- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Solución de partida de las muestras
- Agitador
- Centrífuga

Preparación de las diluciones de las muestras

1. Etiquete un tubo de microcentrífuga diferente para cada muestra diluida:
   - **Hígado**
   - **Riñón**
   - **Cerebro**
2. Añada el volumen de agua requerido (disolvente) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de la muestra	Volumen de disolvente (µL)
1	Hígado	19,0
2	Riñón	19,0
3	Cerebro	19,0

3. Añada el volumen de solución de partida de las muestras requerido (disolvente) a cada tubo vacío:

Tubo	Nombre de la muestra	Volumen de muestra (µL)
1	Hígado	1,0
2	Riñón	1,0
3	Cerebro	1,0

4. Agite cada muestra diluida entre 3 y 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos.

Notas

5. Coloque las muestras diluidas en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de C_T comparativos:

- Podría necesitar diluciones de las muestras porque el volumen de las muestras se limita al 10% del volumen total de la reacción en el software StepOne. Debe realizar diluciones de las muestras antes de añadir las muestras a la mezcla de reacción final.
- Para conseguir un rendimiento óptimo de los TaqMan® Gene Expression Assays o los Custom TaqMan® Gene Expression Assays, utilice entre 10 y 100 ng de molde de cDNA por 20-µL de reacción. Para reactivos tipo rápido, Applied Biosystems recomienda 10 ng.
- Utilice tampón TE o agua para diluir la muestra.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de los ensayos de Applied Biosystems, consulte:

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

Preparación de la mezcla de reacción

Prepare la mezcla de reacción con los componentes y volúmenes que ha calculado el software StepOne ("Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de TP53" en la página 143 y "Complete la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la mezcla de reacción) para el ensayo de GAPDH" en la página 144).

Nota: El software calcula todos los componentes de las reacciones de PCR. Sin embargo, para preparar la mezcla de reacción de esta sección, incluya únicamente la mezcla maestra, el ensayo y agua. Añada la muestra cuando prepare la placa de reacción (consulte "Preparación de la placa de reacción" en la página 163).

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- Los componentes de la mezcla de reacción son:
  - TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2✕)
  - Ensayo de TP53 (20✕)
  - Ensayo de GAPDH (20✕)
  - Agua

Notas

- Los volúmenes calculados en el software para ambos ensayos diana son:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción
Mezcla maestra (2X)	10,0
Ensayo (20X)	1,0
H_2O	7,0
Volumen total	18,0

Nota: En este momento, no se añade la muestra.

Materiales necesarios

- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Componentes de la mezcla de reacción (enumerados arriba)
- Centrífuga

Preparación de la mezcla de reacción

¡IMPORTANTE! Prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana por separado.

1. Etiquete un tubo del tamaño apropiado para cada mezcla de reacción:
   - **Mezcla de reacción para TP53**
   - **Mezcla de reacción para GAPDH**
2. Para el ensayo de TP53, añada los volúmenes requeridos de cada componente al tubo de la mezcla de reacción de TP53:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción	Volumen (µL) para 12 reacciones (más un exceso del 10%)
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X)	10,0	132,0
Ensayo de TP53 (20X)	1,0	13,2
Agua	7,0	92,4
Volumen total de la mezcla de reacción	18,0	237,6

Notas

3. Para el ensayo de GAPDH, añada los volúmenes requeridos de cada componente al tubo de la mezcla de reacción de GAPDH:

Componente	Volumen (µL) para 1 reacción	Volumen (µL) para 12 reacciones (más un exceso del 10%)
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X)	10,0	132,0
Ensayo de GAPDH (20X)	1,0	13,2
Agua	7,0	92,4
Volumen total de la mezcla de reacción	18,0	237,6

4. Para mezclar la mezcla de reacción de cada tubo, pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tápelos.
5. Centrifugue brevemente los tubos para quitar las burbujas de aire.
6. Coloque las mezclas de las reacciones en hielo hasta que prepare la placa de reacción.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de C_T comparativos:

- Si el experimento incluye más de un ensayo diana, prepare la mezcla de reacción para cada ensayo diana de manera separada.
- Incluya un volumen de exceso en los cálculos para compensar la pérdida que se produce durante las transferencias de reactivos. Applied Biosystems recomienda un volumen de exceso de al menos el 10%.
- Incluya todos los componentes requeridos.
- Prepare los reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Mantenga los ensayos protegidos de la luz, en el refrigerador, hasta que esté listo para usarlos. Una exposición excesiva a la luz puede afectar a las sondas fluorescentes.
- Antes de utilizarlo:
  - Dé vueltas al bote para mezclar bien la mezcla maestra.
  - Agite el ensayo para resuspenderlo y, a continuación, centrifugue brevemente el tubo.
  - Para descongelar las muestras congeladas, colóquelas en hielo. Una vez descongeladas, agite las muestras para resuspenderlas y, a continuación, centrifugue los tubos brevemente.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la preparación de la mezcla de reacción, consulte el protocolo apropiado para los reactivos que está utilizando en las reacciones de PCR:

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Notas

- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

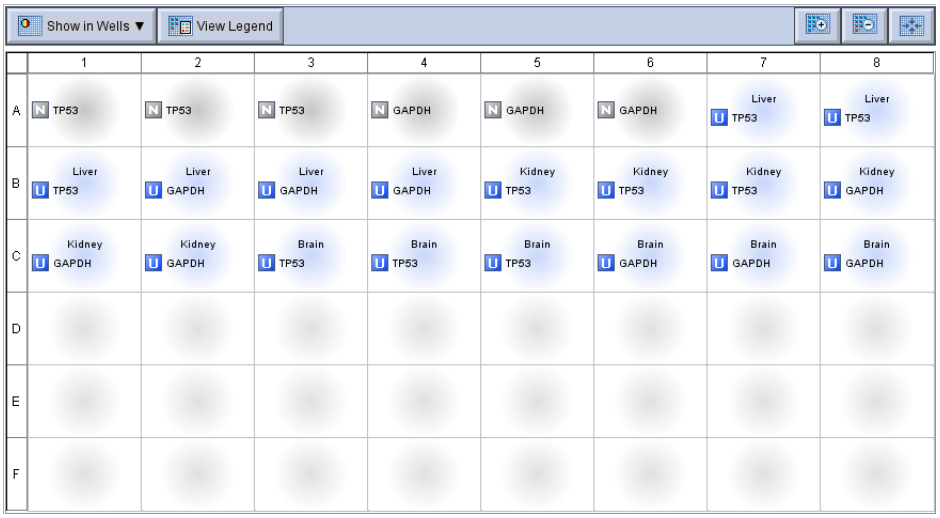
Preparación de la placa de reacción

Prepare las reacciones para cada grupo de réplicas y, a continuación, transfiéralas a la placa de reacción. Utilice la disposición de la placa que se muestra en el software StepOne.

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de C_T comparativos de ejemplo:

- Se utiliza una MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate.
- El volumen de la reacción es de 20 µL/pocillo.
- La placa de reacción contiene:
  - 18 pocillos desconocidos U
  - 6 pocillos de control negativo N
  - 24 pocillos vacíos
- Se utiliza la disposición de la placa que genera automáticamente el software StepOne:


Show in Wells
View Legend
1 2 3 4 5 6 7 8
A N TP53 N TP53 N TP53 N GAPDH N GAPDH N GAPDH U Liver TP53 U Liver TP53
B U Liver TP53 U Liver GAPDH U Liver GAPDH U Liver GAPDH U Kidney TP53 U Kidney TP53 U Kidney TP53 U Kidney GAPDH
C U Kidney GAPDH U Kidney GAPDH U Brain TP53 U Brain TP53 U Brain TP53 U Brain GAPDH U Brain GAPDH U Brain GAPDH
D
E
F

Materiales necesarios

- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Mezcla de reacción para TP53 (página 161)
- Mezcla de reacción para GAPDH (página 161)
- Agua
- Muestras (página 159)
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- Centrífuga

Notas

Preparación de la placa de reacción

1. Para cada gen diana, prepare las reacciones de control negativo:
   a. A un tubo del tamaño apropiado, añada los volúmenes de la mezcla de reacción y de agua que se indican a continuación.

Tubo	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (µL)	Volumen de agua (µL)
1	Mezcla de reacción para TP53	59,4	6,6
2	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	6,6

   b. Para mezclar la reacción, pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape el tubo.
   c. Centrifugue brevemente el tubo para quitar las burbujas de aire.
   d. Añada 20 µL de la reacción de control negativo a los pocillos apropiados de la placa de reacción.

2. Por cada grupo de réplicas, prepare las reacciones para los elementos desconocidos o muestras:
   a. A tubos del tamaño adecuado, añada los volúmenes de la mezcla de reacción y de las muestras que se indican a continuación.

Tubo	Reacción desconocida	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (µL)	Muestra	Volumen de muestra (µL)
1	Hígado TP53	Mezcla de reacción para TP53	59,4	Hígado	6,6
2	Riñón TP53	Mezcla de reacción para TP53	59,4	Riñón	6,6
3	Cerebro TP53	Mezcla de reacción para TP53	59,4	Cerebro	6,6
4	GAPDH en hígado	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	Hígado	6,6
5	GAPDH en riñón	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	Riñón	6,6

Notas

Tubo	Reacción desconocida	Mezcla de reacción	Volumen de la mezcla de reacción (µL)	Muestra	Volumen de muestra (µL)
6	Cerebro GAPDH	Mezcla de reacción para GAPDH	59,4	Cerebro	6,6

b. Para mezclar las reacciones, pipetee suavemente hacia arriba y hacia abajo y, a continuación, tape los tubos.

c. Centrifugue brevemente los tubos para quitar las burbujas de aire.

d. Añada 20 µL de la mezcla de reacción desconocida (muestra) a los pocillos apropiados de la placa.

3. Selle la placa de reacción con película adhesiva óptica.

4. Centrifugue brevemente la placa de reacción para quitar las burbujas de aire.

5. Hasta que esté preparado para realizar la reacción, coloque la placa de reacción en hielo en un sitio oscuro.

Directrices de preparación

Cuando prepare su propio experimento de C_T comparativos:

- Procure utilizar los consumibles adecuados.
- Asegúrese de que la colocación de las reacciones de PCR se corresponde con la disposición de la placa que se muestra en el software StepOne. Puede:
  - Aceptar la disposición de la placa que genera automáticamente el software.

    o
  - Utilizar el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) para cambiar la disposición de la placa en el software.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de:

- La preparación de la placa de reacción, consulte el protocolo apropiado para los reactivos que está utilizando en las reacciones de PCR:
  - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- Los consumibles, consulte la página 3.
- El uso del flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) para cambiar la disposición de la placa, consulte "Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)" en la página 206.

Notas

Notas

8 Realización del experimento de C_T comparativos

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Resumen del capítulo 168
- Preparación de la reacción 169
- Realización del experimento. 171

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

Resumen del capítulo

En este capítulo, se explica cómo realizar una reacción en Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para realizar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.

Inicio del experimento

▼

Diseño del experimento (Capítulo 6)

▼

Preparación del experimento (Capítulo 7)

▼

Realización del experimento (Capítulo 8)

1. Prepare el proceso.
2. Active las opciones de notificación.
3. Inicie el proceso.
4. Monitorice el proceso.
5. Descargue el instrumento y transfiera los datos.

▼

Análisis del experimento (Capítulo 9)

▼

Fin del experimento

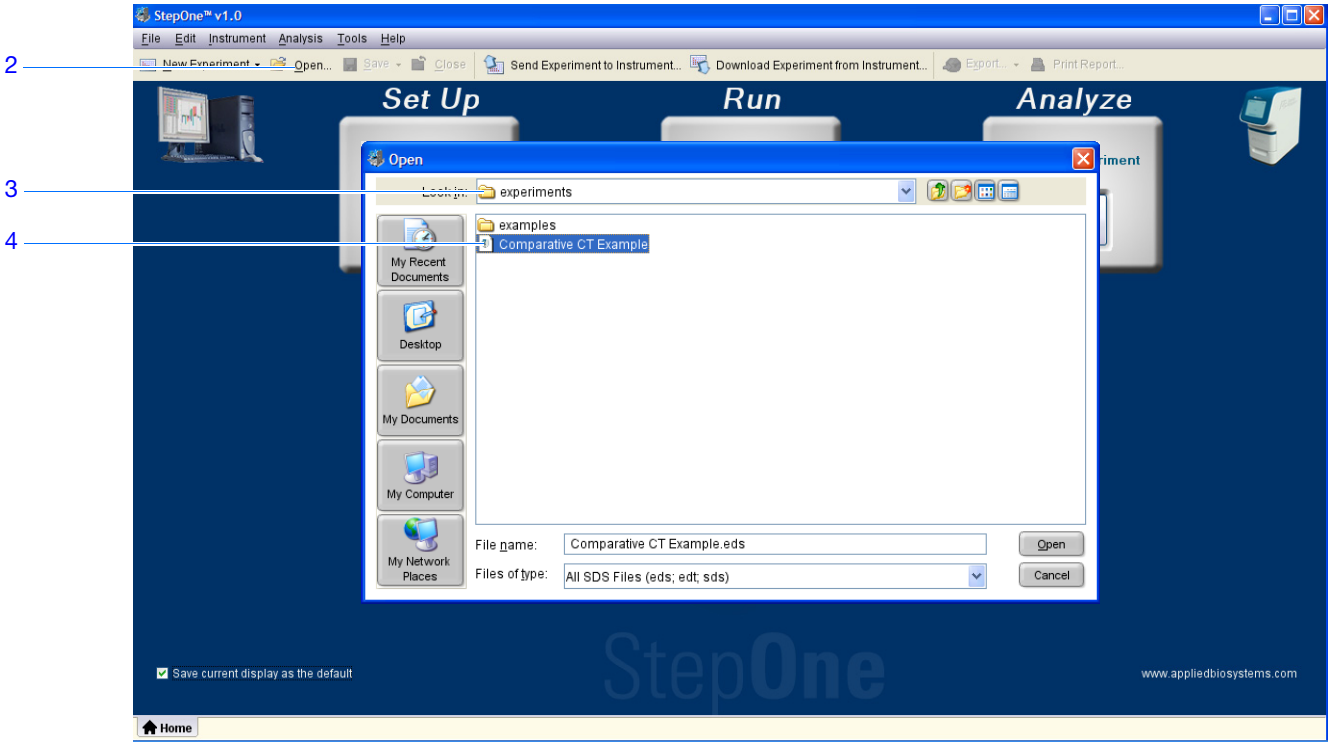
Notas

Preparación de la reacción

Para preparar el proceso, abra el experimento y cargue la MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate en el instrumento StepOne™.

Apertura del experimento de ejemplo

1. Si aún no se está ejecutando el software StepOne™, haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Open** (Abrir).
3. En el cuadro de diálogo Open (Abrir), desplácese hasta la carpeta **experiments** (experimentos) (predeterminada).
4. Haga doble clic en **Comparative C_T Example** (Ejemplo de C_T comparativos) para abrir el archivo del experimento de ejemplo que ha creado en el Capítulo 6.



8

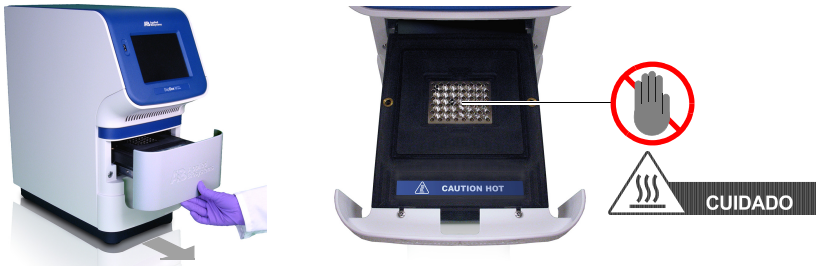
Notas

Carga de la placa de reacción

CAUTION **PELIGRO DE LESIONES FÍSICAS.** Durante el uso del instrumento, la temperatura del bloque puede superar los 100 °C. Si el instrumento se ha utilizado recientemente, mantenga las manos alejadas de él hasta que el bloque alcance la temperatura ambiente.

¡IMPORTANTE! Lleve guantes sin polvo para manejar la placa de reacción.

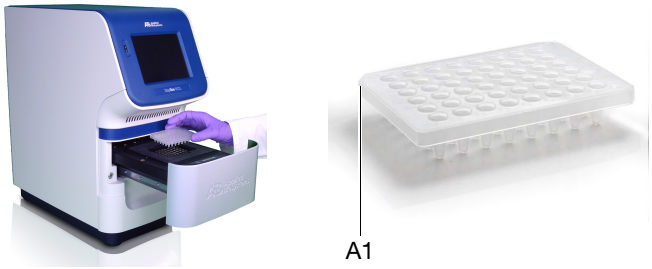
1. Abra la bandeja del instrumento.



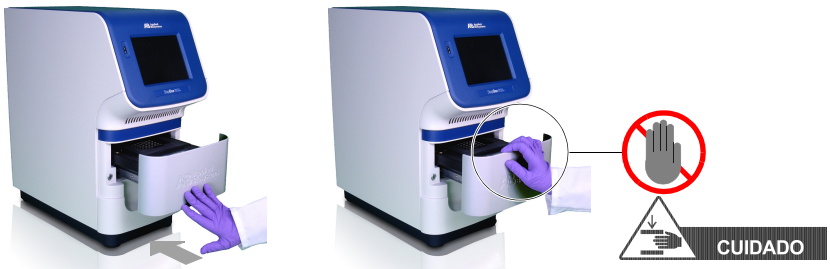
2. Coloque las reacciones en el bloque.

   La colocación de las reacciones depende del tipo de consumible que se utilice:

   - Si utiliza una placa de reacción, colóquela con el pocillo A1 en la esquina posterior izquierda.
   - Si utiliza tiras de tubos de reacción, colóquelas en el bloque directamente.



3. Cierre cuidadosamente la bandeja del instrumento.



Notas

Realización del experimento

Realice los siguientes procedimientos del capítulo 4:

- "(Opcional) Activación de las notificaciones" en la página 71
- "Inicio de la reacción" en la página 73
- "Monitorización de la reacción" en la página 76
- "Descarga de la placa de reacción y transferencia de datos" en la página 87

Asegúrese de seleccionar el archivo **Comparative CT Example.eds** en lugar del archivo **Relative Standard Curve Example.eds**.

Notas

Notas

9 Análisis del experimento de C_T comparativos

Este capítulo cubre los siguientes temas:

- Resumen del capítulo 174
- Sección 9.1 Revisión de los resultados 175
- Sección 9.2 Solución de problemas 193

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

Resumen del capítulo

El software StepOne™ analiza los datos con el método de cuantificación de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$). En la primera sección de este capítulo, se explica cómo revisar los datos analizados utilizando las pantallas de análisis y cómo presentar los datos. Si los resultados son cuestionables, en la Sección 2 de este capítulo se explican algunos pasos para solucionar los problemas.

Flujo de trabajo del experimento de ejemplo

A continuación, se muestra el flujo de trabajo para analizar el experimento de ejemplo que se incluye en esta guía de introducción.

Experimento de C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$)

Inicio del experimento

▼

Diseño del experimento (Capítulo 6)

▼

Preparación de las reacciones (Capítulo 7)

▼

Realización del experimento (Capítulo 8)

▼

Análisis del experimento (Capítulo 9)

Sección 1. Revisión de los resultados:

1. Analice.
2. Revise la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) o la tabla de pocillos.
3. Revise la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación).
4. Presente los datos.

Sección 2. Solución de problemas:

1. Revise las opciones de análisis; ajuste la línea basal y el umbral.
2. Revise la pantalla QC Summary (Resumen QC).
3. Omita pocillos.
4. Revise la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente).
5. Revise la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos).

▼

Fin del experimento

Notas

Sección 9.1 Revisión de los resultados

Esta sección cubre los siguientes temas:

- Análisis del experimento 176
- Revisión de la gráfica de expresión génica y la tabla de pocillos 182
- Revisión de la gráfica de amplificación 185
- Presentación de los datos 191

Notas

Análisis del experimento

El software StepOne analiza el experimento y muestra los resultados en las pantallas de análisis (por ejemplo, en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), QC Summary (Resumen QC), etc.)

Acerca del experimento de ejemplo

Para el experimento de C_T comparativos de ejemplo, utilice el archivo de datos que se instala con el software StepOne. Este archivo de datos se ha creado con los mismos parámetros de diseño que se indican en el Capítulo 6 y luego se ha procesado y analizado en un instrumento StepOne™.

Encontrará el archivo de datos del experimento de ejemplo en su ordenador:

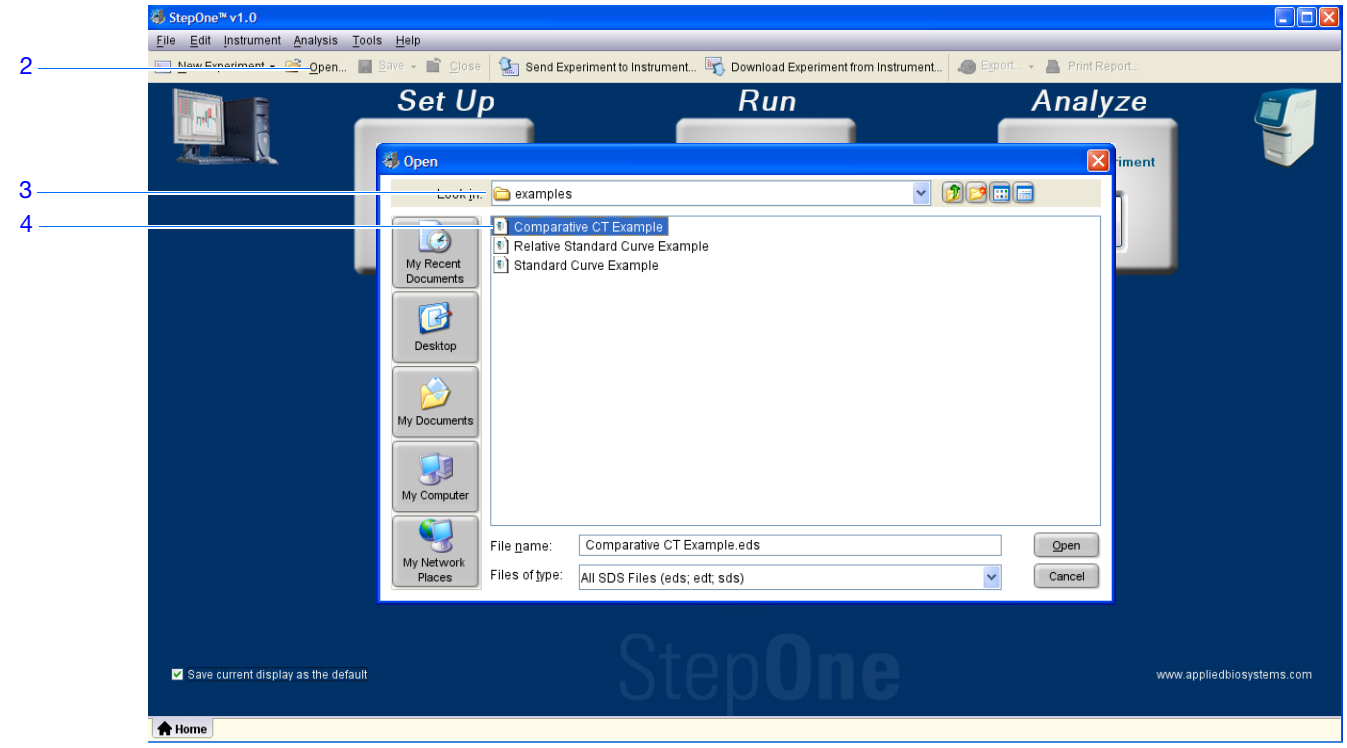
<*unidad*>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

donde <*unidad*> es la unidad del disco duro del ordenador en la que está instalado el software de StepOne. La unidad de instalación predeterminada del software es la unidad C.

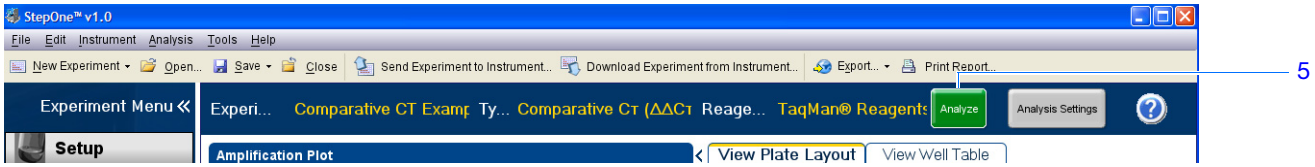
Análisis del experimento de ejemplo

1. Si aún no se está ejecutando el software StepOne, haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
2. En la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Open** (Abrir).
3. En el cuadro de diálogo Open (Abrir), desplácese hasta la carpeta **examples** (ejemplos).
4. Haga doble clic en **Comparative CT Example** (Ejemplo de C_T comparativos) para abrir el archivo de datos del experimento de ejemplo.

Notas



5. Haga clic en **Analyze** (Analizar). El software analiza los datos utilizando las opciones de análisis predeterminadas.



6. Consulte "Elementos del software" más adelante y "Consejos de desplazamiento" en la página 179 para obtener información acerca de cómo desplazarse por las pantallas de análisis.

Directrices

Cuando analice su propio experimento de C_T comparativos:

- Inmediatamente después de una reacción, el software StepOne analiza automáticamente los datos utilizando las opciones de análisis predeterminadas y, a continuación, muestra la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) en el ordenador.
- Para volver a analizar los datos, seleccione todos los pocillos de la disposición de la placa y, a continuación, haga clic en **Analyze** (Analizar).

Notas

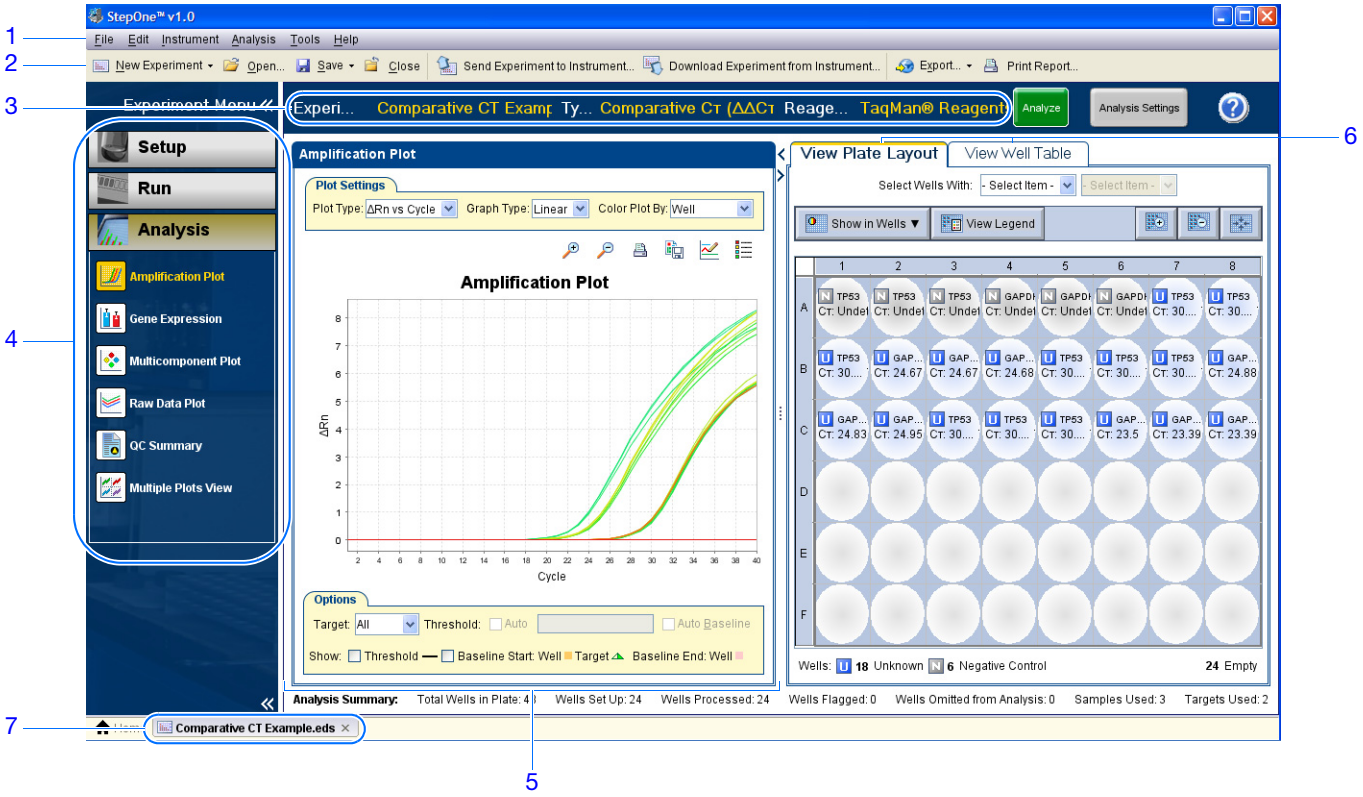
Elementos del software

A continuación, se ilustran los elementos del software StepOne de las pantallas de análisis.

1. Barra de menús: muestra los menús disponibles en el software:
   - File (Archivo)
   - Edit (Edición)
   - Instrument (Instrumento)
   - Analysis (Análisis)
   - Tools (Herramientas)
   - Help (Ayuda)
2. Barra de herramientas: muestra las herramientas disponibles en el software:
   - New Experiment (Experimento nuevo)
   - Open (Abrir)
   - Save (Guardar)
   - Close (Cerrar)
   - Send Experiment to Instrument (Enviar experimento al instrumento)
   - Download Experiment from Instrument (Descargar experimento del instrumento)
   - Export (Exportar)
   - Print Report (Imprimir informe)
3. Cabecera del experimento: indica el nombre del experimento, el tipo de experimento y los reactivos del experimento abierto.
4. Panel de menús del experimento: incluye vínculos a las siguientes pantallas del software:
   - Pantallas de configuración
   - Pantallas del perfil de reacción
   - Pantallas de análisis:
     –Amplification Plot (Gráfica de amplificación)
     –Gene Expression (Expresión génica)
     –Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente)
     –Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos)
     –QC Summary (Resumen QC)
     –Multiple Plots View (Vista de múltiples gráficas)
5. Panel de gráficas: muestra la pantalla de análisis seleccionada para el experimento abierto.
6. Fichas de visualización: muestra la disposición de la placa o la tabla de pocillos del experimento abierto.

Notas

7. Fichas del experimento: muestra una ficha por cada experimento abierto.



Consejos de desplazamiento

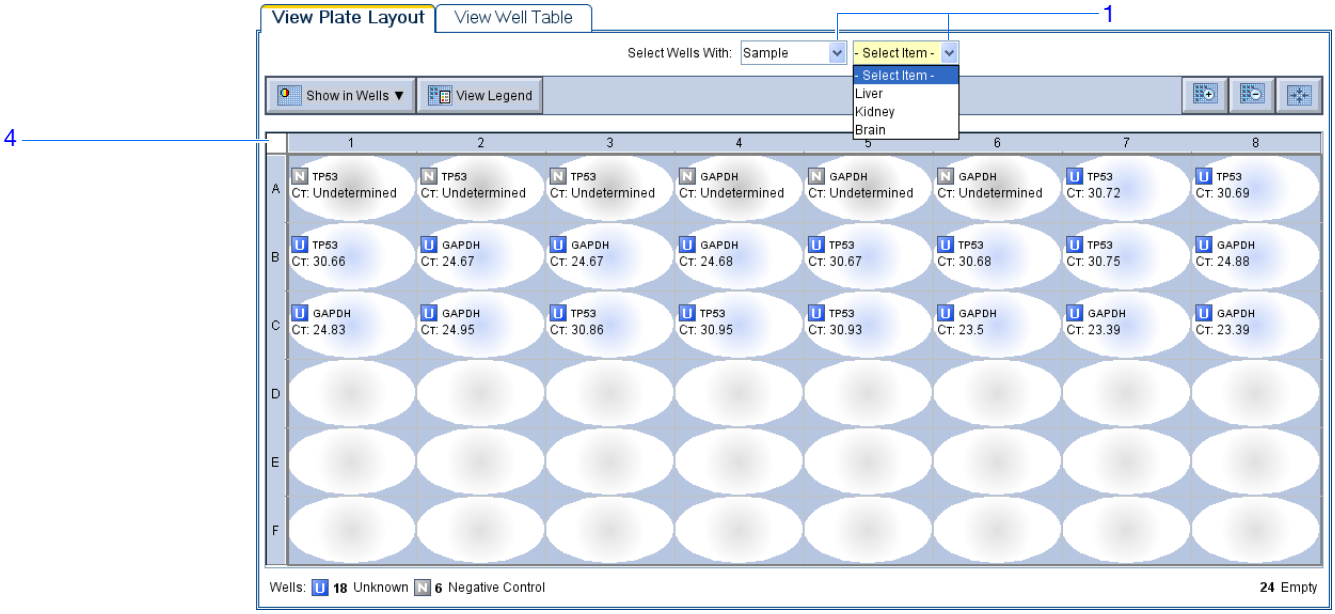
Cómo seleccionar pocillos

Para ver pocillos específicos en las pantallas de análisis, seleccione los pocillos en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa) de la siguiente manera:

1. Para seleccionar pocillos de un tipo específico, utilice los menús desplegables Select Wells With (Seleccionar pocillos con): seleccione **Sample** (Muestra), **Target** (Diana) o **Task** (Tarea) y, a continuación, seleccione el nombre de la muestra, el gen diana o la tarea.
2. Para seleccionar un solo pocillo, haga clic en él en la disposición de la placa.
3. Para seleccionar varios pocillos, haga clic y arrastre el ratón por encima de los pocillos deseados, pulse **CTRL+clic**, o pulse **Mayús+clic** en la disposición de la placa.

Notas

4. Para seleccionar los 48 pocillos, haga clic en la esquina superior izquierda de la disposición de la placa.



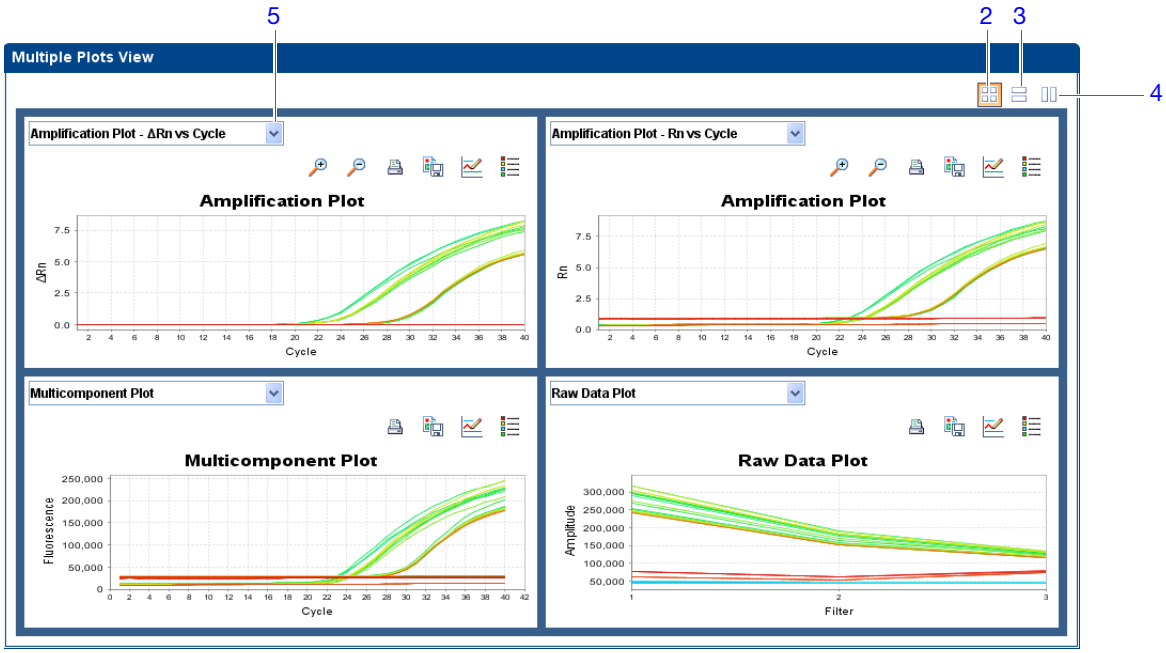
Cómo ver múltiples gráficas

Utilice la vista Multiple Plots (Múltiples gráficas) para ver simultáneamente hasta cuatro gráficas. Para desplazarse por la vista Multiple Plots (Múltiples gráficas):

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Multiple Plots View** (Vista de múltiples gráficas).
2. Para ver cuatro gráficas, haga clic en **Show plots in a 2 × 2 matrix** (Mostrar gráficas en una matriz de 2 X 2).
3. Para ver dos gráficas en filas, haga clic en **Show plots in two rows** (Ver gráficas en dos filas).
4. Para ver dos gráficas en columnas, haga clic en **Show plots in two columns** (Ver gráficas en dos columnas).

Notas

5. Para ver una gráfica específica, seleccione la gráfica en el menú desplegable situado encima de la visualización de cada gráfica.



Notas

Revisión de la gráfica de expresión génica y la tabla de pocillos

La pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) muestra los resultados de los cálculos de cuantificación relativa a través del perfil de expresión génica. Hay disponibles dos gráficas:

- **RQ vs Target** (Cuantificación relativa vs diana): agrupa los valores de cuantificación relativa (RQ) por diana. Se traza cada muestra para cada gen diana.
- **RQ vs Sample** (Cuantificación relativa vs muestra): agrupa los valores de cuantificación relativa (RQ) por muestra. Se traza cada gen diana para cada muestra.

Cada gráfica se puede ver de las siguientes formas: lineal, log10, Ln, log2.

En la tabla de pocillos, se muestran datos de cada pocillo de la placa de reacción, incluidos:

- El nombre de la muestra, el nombre de el gen diana, la tarea y los fluorocromos
- El ciclo umbral calculado (C_T), la fluorescencia normalizada (Rn) y los valores de cantidades
- Avisos

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, se revisa:

- Cada gen diana de la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) para el nivel de expresión (o cambio en número de veces de la expresión) de la muestra de gen diana en relación con la muestra de referencia.
- La tabla de pocillos para evaluar la precisión de los grupos de réplicas.

Revisión de la gráfica de expresión génica y la tabla de pocillos

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Gene Expression** (Expresión génica).

   Nota: Si en la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. En la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica):
   a. En el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica), seleccione **RQ vs Sample** (Cuantificación relativa vs Muestra).
   b. En el menú desplegable Graph Type (Tipo de gráfica), seleccione **Log10**.
   c. En el menú desplegable Orientation (Orientación), seleccione **Vertical Bars** (Barras verticales).

Notas

d. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).

En el experimento de ejemplo, se muestra el nivel de expresión de TP53 en el hígado y el riñón en relación con su nivel de expresión en la muestra de referencia (cerebro). Dado que la muestra de referencia se compara consigo misma, el nivel de expresión es 1. Si el resultado se muestra en el tipo de gráfico Log10, el nivel de expresión de la muestra de referencia aparece como 0 en el gráfico (log10 de 1=0).

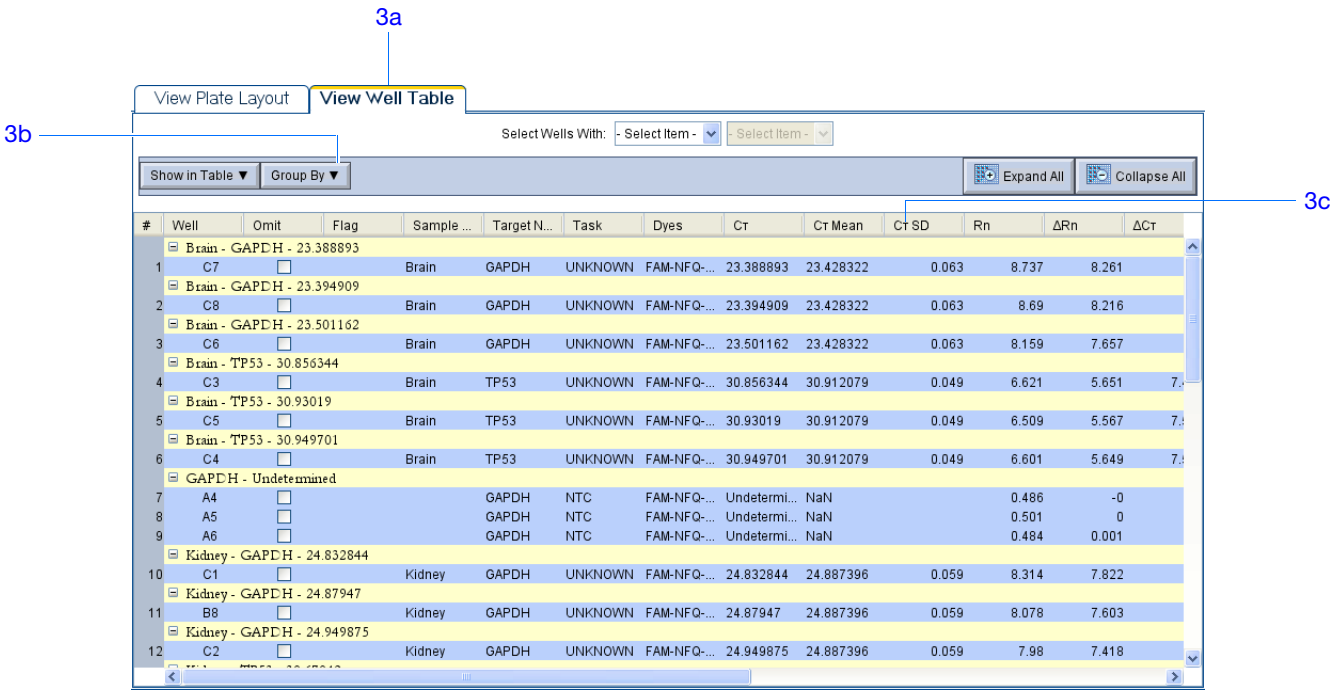
3. Revise la tabla de pocillos:

   a. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación) y, a continuación, seleccione la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).

   b. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Réplica).

   c. Fíjese en la columna C_T SD para evaluar la precisión de los grupos de réplicas. En el experimento de ejemplo, no hay ningún valor atípico.

Notas


3a
3b
3c
View Plate Layout
View Well Table
Select Wells With:
- Select Item -
- Select Item -
Show in Table ▼
Group By ▼
Expand All
Collapse All
Well Omit Flag Sample ... Target N... Task Dyes Ct Ct Mean Ct SD Rn ΔRn ΔCt
Brain - GAPDH - 23.388893
1 C7 Brain GAPDH UNKNOWN FAM-NFQ-... 23.388893 23.428322 0.063 8.737 8.261
Brain - GAPDH - 23.394909
2 C8 Brain GAPDH UNKNOWN FAM-NFQ-... 23.394909 23.428322 0.063 8.69 8.216
Brain - GAPDH - 23.501162
3 C6 Brain GAPDH UNKNOWN FAM-NFQ-... 23.501162 23.428322 0.063 8.159 7.657
Brain - TP53 - 30.856344
4 C3 Brain TP53 UNKNOWN FAM-NFQ-... 30.856344 30.912079 0.049 6.621 5.651
Brain - TP53 - 30.93019
5 C5 Brain TP53 UNKNOWN FAM-NFQ-... 30.93019 30.912079 0.049 6.509 5.567
Brain - TP53 - 30.949701
6 C4 Brain TP53 UNKNOWN FAM-NFQ-... 30.949701 30.912079 0.049 6.601 5.649
GAPDH - Undetermined
7 A4 GAPDH NTC FAM-NFQ-... Undetermi... NaN 0.486 -0
8 A5 GAPDH NTC FAM-NFQ-... Undetermi... NaN 0.501 0
9 A6 GAPDH NTC FAM-NFQ-... Undetermi... NaN 0.484 0.001
Kidney - GAPDH - 24.832844
10 C1 Kidney GAPDH UNKNOWN FAM-NFQ-... 24.832844 24.887396 0.059 8.314 7.822
Kidney - GAPDH - 24.87947
11 B8 Kidney GAPDH UNKNOWN FAM-NFQ-... 24.87947 24.887396 0.059 8.078 7.603
Kidney - GAPDH - 24.949875
12 C2 Kidney GAPDH UNKNOWN FAM-NFQ-... 24.949875 24.887396 0.059 7.98 7.418

Nota: Para mostrar u ocultar columnas en la tabla de pocillos, marque/desmarque el nombre de columna en el menú desplegable Show in Table (Mostrar en tabla).

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de C_T comparativos, busque:

- Diferencias en la expresión génica (como un cambio en número de veces de la expresión) en relación con la muestra de referencia.
- Desviación estándar en los grupos de réplicas (valores C_T SD). Si es preciso, omita los valores atípicos (consulte "Omisión de pocillos para el análisis" en la página 197).

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión génica) o la tabla de pocillos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Revisión de la gráfica de amplificación

En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), se muestra la amplificación de todas las muestras de los pocillos seleccionados. Hay disponibles tres gráficas:

- **ΔR_n vs Cycle** (ΔR_n vs ciclo): ΔR_n es la variación de la señal de fluorescencia normalizada generada en cada ciclo de la reacción de PCR y son los datos a partir de los cuales se calcula C_T. En esta gráfica, ΔR_n se muestra en función del número de ciclo. La gráfica sirve para identificar y examinar las amplificaciones irregulares y para ver los valores del umbral y línea basal de la reacción.
- **R_n vs Cycle** (R_n vs ciclo): Rn es la fluorescencia de fluorocromo del notificador normalizada. En esta gráfica, Rn se muestra en función del número de ciclo. La gráfica sirve para identificar y examinar las amplificaciones irregulares.
- **C_T vs Well** (C_T vs pocillo): el ciclo umbral (C_T) es el número de ciclo de PCR en el cual el nivel de fluorescencia corta el umbral. En esta gráfica, C_T se muestra en función de la posición del pocillo. La gráfica sirve para localizar amplificaciones con valores atípicos.

Cada gráfica se puede ver de las siguientes formas: lineal o log10.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, hay que revisar cada gen diana en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) para buscar:

- Valores de umbral y línea basal correctos
- Valores atípicos

Revisión de la gráfica de amplificación

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación).

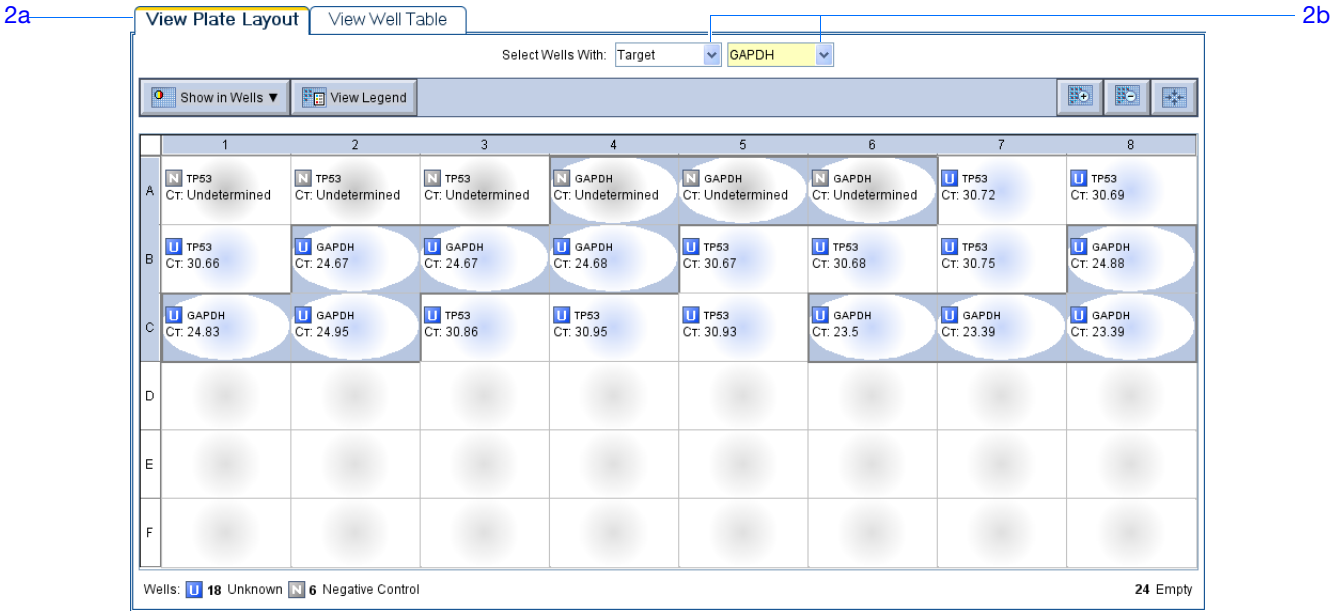
Nota: Si en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

Notas

2. Observe los pocillos de GAPDH en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación):

   a. Haga clic en la ficha **View Plate Layout** (Ver disposición de placa).

   b. En los menús desplegables Select Wells With (Seleccionar pocillos con), seleccione **Target** (Diana) y, a continuación, **GAPDH**.



3. En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación):

   a. En el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica), seleccione **ΔR_n vs Cycle** (ΔR_n vs ciclo).

   b. En el menú desplegable Color Plot By (Colorear gráfica por), seleccione **Well** (Pocillo).

   c. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).

Notas

4. Observe los valores de la línea basal:

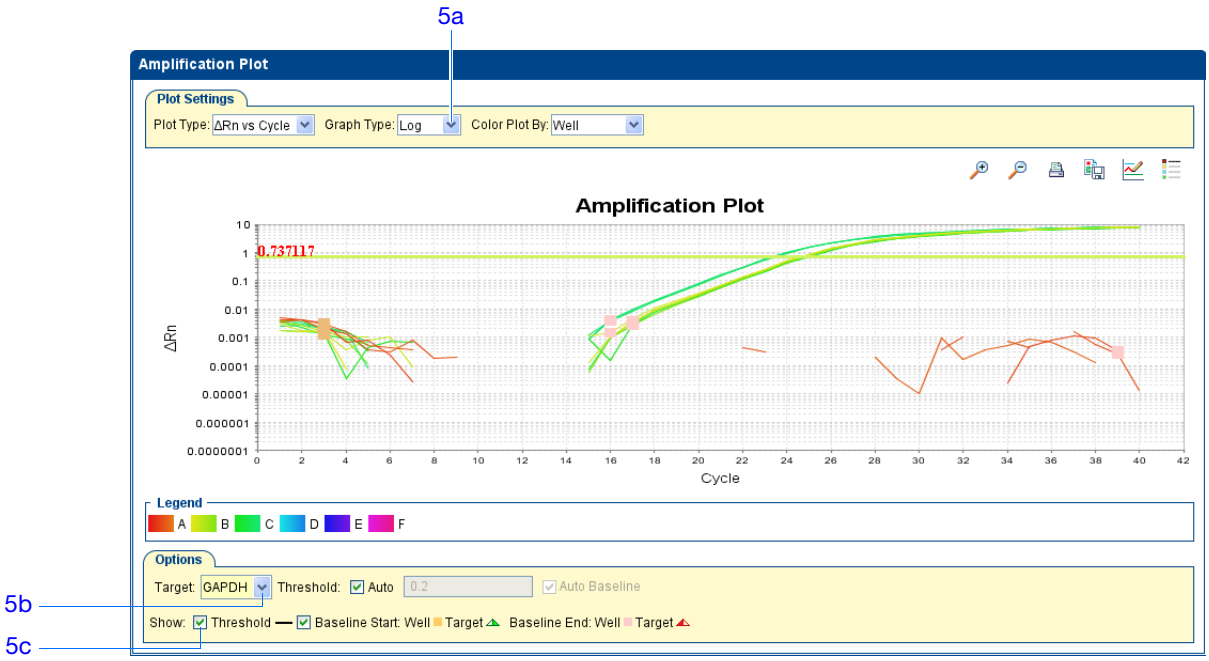
   a. En el menú desplegable Graph Type (Tipo de gráfica), seleccione **Linear** (Lineal).

   b. Active la casilla de verificación **Baseline** (Línea basal) para ver los ciclos inicial y final de la línea basal.

   c. Compruebe que la línea basal está ajustada correctamente. En el experimento del ejemplo, la línea basal termina antes de que se inicie la amplificación.

Notas

5. Observe los valores de umbral:
   a. En el menú desplegable Graph Type (Tipo de gráfica), seleccione **Log** (Registro).
   b. En el menú desplegable Target (Diana), seleccione **GAPDH**.
   c. Active la casilla de verificación **Threshold** (Umbral) para ver el umbral.
   d. Compruebe que el umbral está situado correctamente. En el experimento de ejemplo, el umbral está en la fase exponencial.

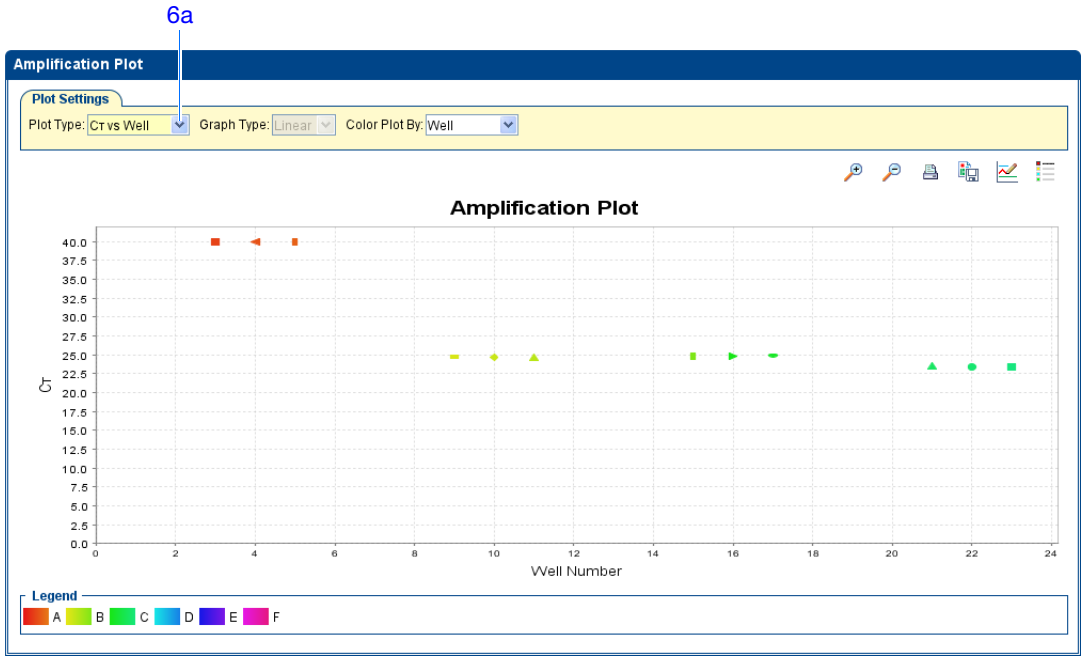


Notas

6. Busque cualquier valor atípico:

   a. En el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica), seleccione **C_T vs Well** (C_T vs pocillo).

   b. Busque pocillos fuera de la curva de amplificación. En el experimento de ejemplo, no hay ningún valor atípico para GAPDH.



7. Repita los pasos 2 a 6 para los pocillos de TP53. En el experimento de ejemplo, no hay ningún valor atípico para TP53.

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de C_T comparativos, busque:

- Los valores de línea basal y umbral correctos: el software StepOne calcula automáticamente los valores de línea basal y umbral dando por hecho que los datos tienen una gráfica de amplificación *típica*. Una gráfica de amplificación típica tiene:

  a. Una fase de meseta o plateau

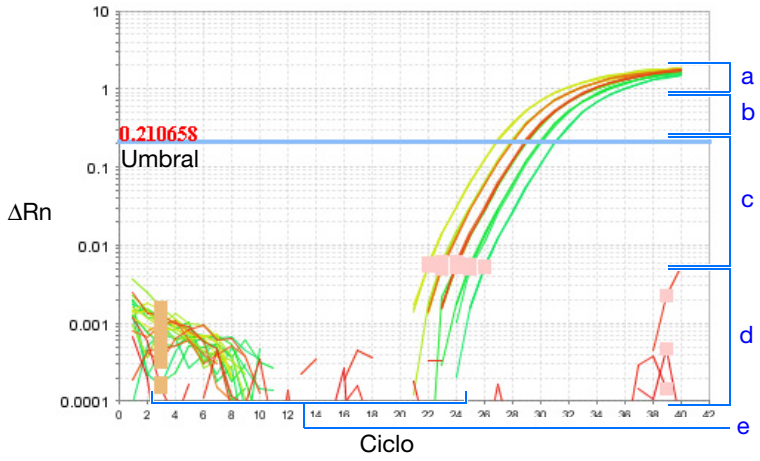
  b. Una fase lineal

  c. Una fase exponencial (geométrica)

  d. Un determinado ruido de fondo

  e. Una línea basal

Notas



¡IMPORTANTE! Los errores en el experimento (por ejemplo, errores de contaminación o pipeteo) pueden producir curvas de amplificación atípicas que pueden derivar a cálculos incorrectos de los valores de línea basal y umbral por parte del software StepOne. Por lo tanto, Applied Biosystems recomienda examinar la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) y revisar los valores de línea basal y umbral asignados a cada pocillo después del análisis.

- Valores atípicos

Si el experimento no cumple las directrices anteriores, solucione los problemas de la siguiente forma:

- Ajuste manualmente la línea basal y/o el umbral (consulte "Revisión de las opciones de análisis" en la página 194).

  O

- Omita pocillos (consulte "Omisión de pocillos para el análisis" en la página 197).

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Presentación de los datos

Hay distintas formas de presentar los datos del experimento:

- Guardando la gráfica como un archivo de imagen
- Imprimiendo la gráfica
- Imprimiendo la disposición de la placa
- Creando diapositivas
- Imprimiendo un informe
- Exportando datos

Para obtener más información acerca de estos procedimientos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Notas

Sección 9.2 Solución de problemas

Esta sección cubre los siguientes temas:

- Revisión de las opciones de análisis 194
- Revisión del resumen QC 196
- Omisión de pocillos para el análisis 197
- Revisión de la gráfica multicomponente 200
- Revisión de la gráfica de datos brutos 203

Notas

Revisión de las opciones de análisis

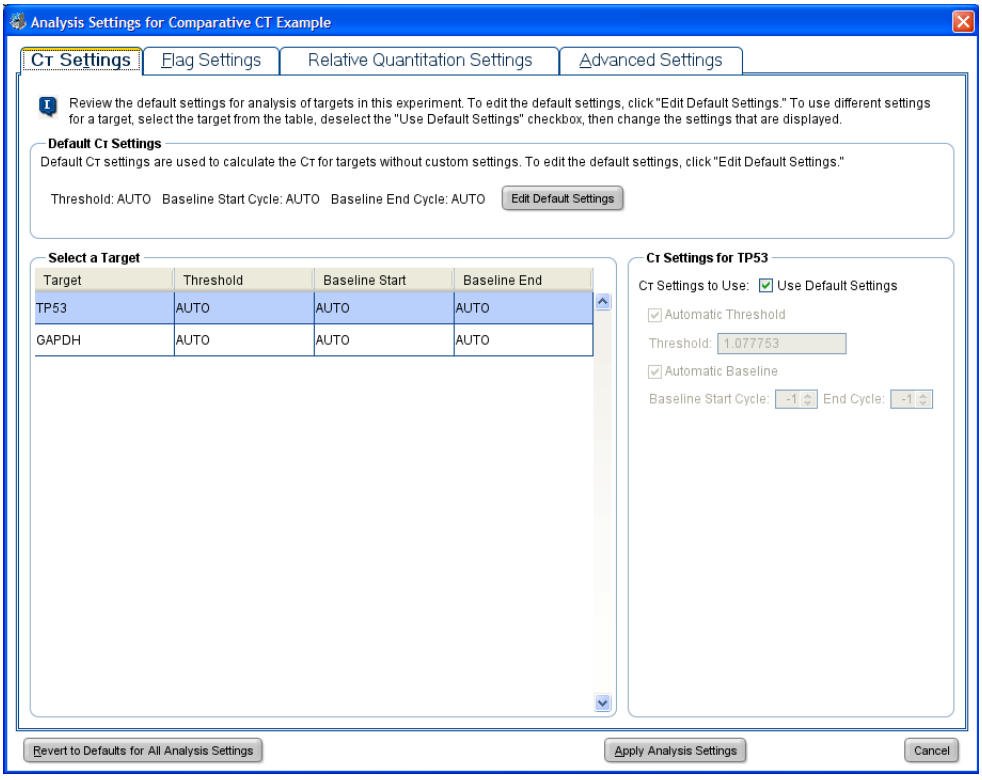
El cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis) muestra las opciones de análisis del ciclo umbral (C_T), los avisos, la cuantificación relativa y las opciones avanzadas. Si las opciones de análisis predeterminadas del software StepOne no son adecuadas para el experimento, puede cambiarlas en el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis) y, a continuación, volver a analizar el experimento.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, se utilizan las opciones de análisis predeterminadas sin ningún cambio.

Revisión de las opciones de análisis

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis).
2. Haga clic en **Analysis Settings** (Opciones de análisis) para abrir el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis).
3. En el experimento de ejemplo, se utilizan opciones de análisis para cada ficha:
   - C_T Settings (Opciones de C_T)
   - Flag Settings (Opciones de avisos)
   - Opciones de cuantificación relativa
   - Advanced Settings (Opciones avanzadas)


Analysis Settings for Comparative CT Example
CT Settings
Flag Settings
Relative Quantitation Settings
Advanced Settings
Review the default settings for analysis of targets in this experiment. To edit the default settings, click "Edit Default Settings." To use different settings for a target, select the target from the table, deselect the "Use Default Settings" checkbox, then change the settings that are displayed.
Default CT Settings
Default CT settings are used to calculate the CT for targets without custom settings. To edit the default settings, click "Edit Default Settings."
Threshold: AUTO Baseline Start Cycle: AUTO Baseline End Cycle: AUTO
Edit Default Settings
Select a Target
Target
Threshold
Baseline Start
Baseline End
TP53
AUTO
AUTO
AUTO
GAPDH
AUTO
AUTO
AUTO
CT Settings for TP53
CT Settings to Use:
Use Default Settings
Automatic Threshold
Threshold:
1.077753
Automatic Baseline
Baseline Start Cycle:
End Cycle:
Revert to Defaults for All Analysis Settings
Apply Analysis Settings
Cancel

Notas

Directrices de análisis

A menos que ya haya determinado cuál son las opciones óptimas para el experimento, utilice las opciones de análisis predeterminadas en el software StepOne. Si las opciones predeterminadas no son adecuadas para el experimento, puede cambiar:

- **C_T Settings** (Opciones de C_T): utilice esta ficha para ajustar manualmente el umbral y la línea basal. Si ajusta manualmente el umbral y la línea basal, Applied Biosystems recomienda lo siguiente:

Opción	Recomendación
Umbral	Introduzca un valor para el umbral de manera que: • Esté por encima del ruido de fondo. • Esté por debajo de las fases de meseta o plateau y fase lineal de la curva de amplificación. • Esté dentro de la fase exponencial de la curva de amplificación.
Línea basal	Seleccione los valores Start Cycle (Ciclo inicial) y End Cycle (Ciclo final) antes de que comience la amplificación.

- **Flag Settings** (Opciones de avisos): utilice esta ficha para:
  - Ajustar la sensibilidad para que se marquen más o menos pocillos.
  - Cambiar los parámetros de los avisos que aplica el software StepOne.
- **Relative Quantitation Settings** (Opciones de cuantificación relativa): utilice esta ficha para:
  - Cambiar la muestra de referencia y/o el control endógeno.
  - Seleccionar el algoritmo que se debe utilizar para determinar los valores mínimos y máximos de RQ (nivel de confianza o desviaciones estándar).
- **Advanced Settings** (Opciones avanzadas): utilice esta ficha para cambiar las opciones de línea basal pocillo a pocillo.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de las opciones de análisis, acceda al software StepOne pulsando **F1** cuando se abra el cuadro de diálogo Analysis Settings (Opciones de análisis).

Notas

Revisión del resumen QC

La pantalla QC Summary (Resumen QC) muestra una lista de avisos del software StepOne, e incluye la frecuencia y ubicación de los mismos en el experimento abierto.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, hay que revisar la pantalla QC Summary (Resumen QC) para saber si los datos del experimento han desencadenado algún aviso. En el experimento de ejemplo, no se ha desencadenado ningún aviso.

Revisión del resumen QC

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **QC Summary** (Resumen QC).

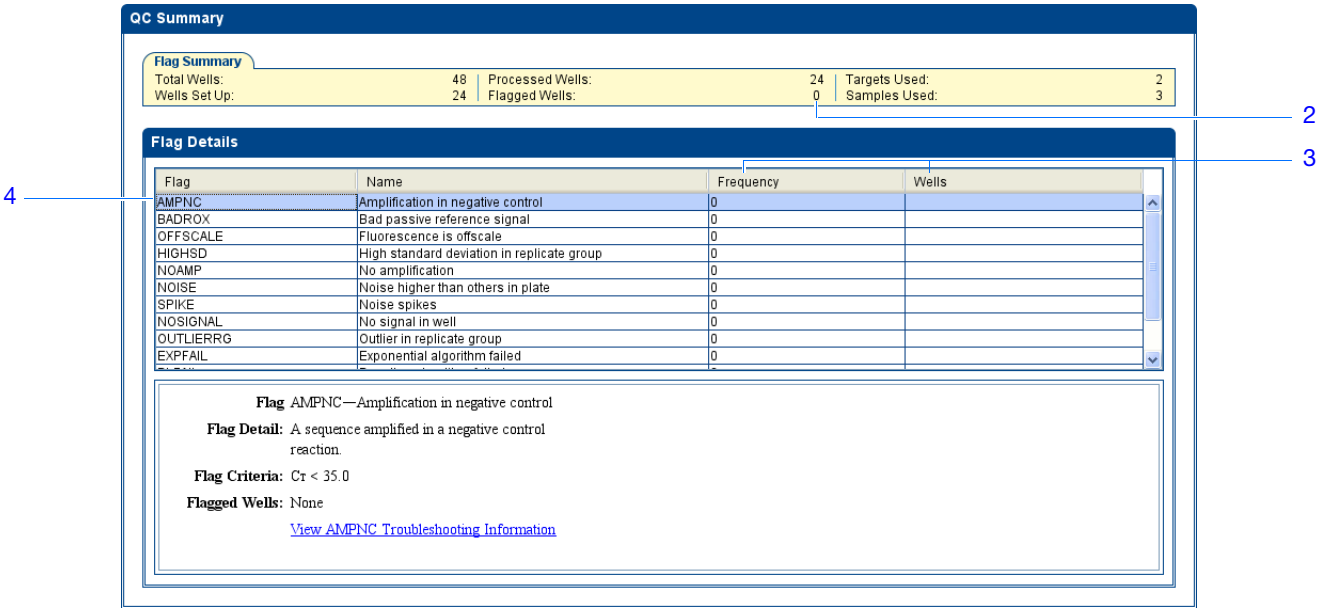
   Nota: Si en la pantalla QC Summary (Resumen QC) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Revise el resumen de avisos. En el experimento de ejemplo, hay 0 pocillos marcados.

3. En la tabla Flag Details (Detalles de aviso), observe las columnas Frequency (Frecuencia) y Wells (Pocillos) para determinar qué avisos aparecen en el experimento. En el experimento de ejemplo, en la columna Frequency (Frecuencia) se muestra 0 en todas las columnas.

   Nota: Un valor 0 en la columna Frequency (Frecuencia) indica que el aviso no aparece en el experimento.

4. (Opcional) Haga clic en cada fila de avisos para ver información detallada acerca del aviso.



Notas

Posibles avisos

En los experimentos de C_T comparativos, los datos del experimento pueden desencadenar los avisos que se indican a continuación.

Si en el experimento no aparece un aviso, su frecuencia será 0. Si la frecuencia es >0, eso significa que el aviso aparece en algún lugar del experimento. La posición del pocillo se indica en la columna Wells (Pocillos).

Aviso	Descripción
AMPNC	Amplificación en control negativo
BADROX	Señal de referencia pasiva incorrecta
BLFAIL	Error del algoritmo de línea basal
CTFAIL	Error del algoritmo C_T
EXPFAIL	Error del algoritmo exponencial
HIGHSD	Desviación estándar alta en el grupo de réplicas
NOAMP	No hay amplificación
NOISE	Ruido mayor que otros pocillos en la placa
NOSIGNAL	No hay señal en el pocillo
OFFSCALE	La fluorescencia está fuera de la escala
OUTLIERRG	Valor atípico en el grupo de réplicas
SPIKE	Picos de ruido
THOLDFAIL	Error en el algoritmo del umbral

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de C_T comparativos:

- Haga clic en cada aviso de la tabla Flag Details (Detalles de avisos) con una frecuencia >0 para ver información detallada acerca del aviso. Si es necesario, haga clic en el vínculo de solución de problemas para saber cómo corregir el aviso.
- Puede cambiar las opciones de los avisos:
  - Ajustar la sensibilidad para que se marquen más o menos pocillos.
  - Cambiar los parámetros de los avisos que aplica el software StepOne.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla QC Summary (Resumen QC) o de las opciones de avisos, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Omisión de pocillos para el análisis

Los errores de los experimentos pueden causar que algunos pocillos se amplifiquen de manera insuficiente o no se amplifiquen. Estos pocillos suelen producir valores C_T que difieren significativamente de los valores medios de los pocillos de réplicas asociadas. Si se incluyen en los cálculos, estos valores atípicos pueden dar lugar a mediciones erróneas; para garantizar la precisión, omita los valores atípicos del análisis.

Notas

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, no hay valores atípicos; no es necesario omitir ningún pocillo del análisis.

Omisión de pocillos

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación).

   Nota: Si en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), seleccione **C_T vs Well** (C_T vs pocillo) en el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica).

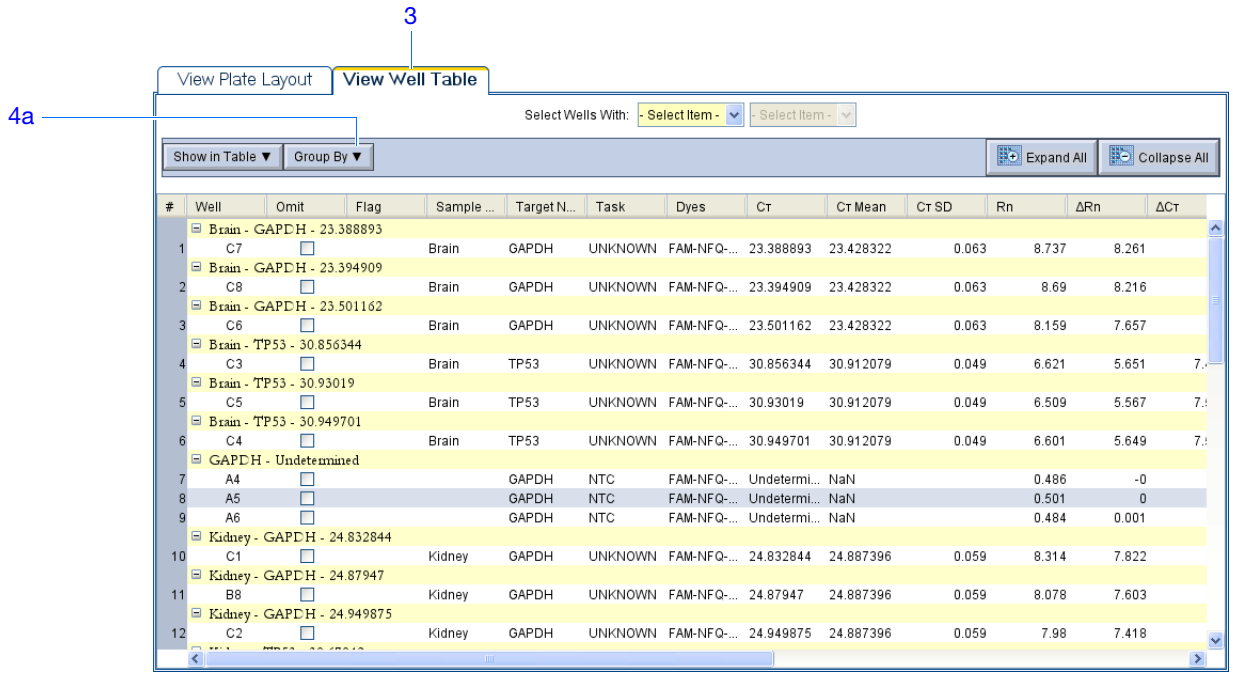
3. Seleccione la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).

Notas

4. En la tabla de pocillos:

   a. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Réplica).

   b. Fíjese si en el grupo de réplicas hay algún valor atípico (asegúrese de que están marcados con un aviso). En el experimento de ejemplo, no hay ningún valor atípico.



#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	Cт	Cт Mean	Cт SD	Rn	ΔRn	ΔCт
	Brain - GAPDH - 23.388893												
1	C7			Brain	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	23.388893	23.428322	0.063	8.737	8.261	
	Brain - GAPDH - 23.394909												
2	C8			Brain	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	23.394909	23.428322	0.063	8.69	8.216	
	Brain - GAPDH - 23.501162												
3	C6			Brain	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	23.501162	23.428322	0.063	8.159	7.657	
	Brain - TP53 - 30.856344												
4	C3			Brain	TP53	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	30.856344	30.912079	0.049	6.621	5.651	7.
	Brain - TP53 - 30.93019												
5	C5			Brain	TP53	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	30.93019	30.912079	0.049	6.509	5.567	7.
	Brain - TP53 - 30.949701												
6	C4			Brain	TP53	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	30.949701	30.912079	0.049	6.601	5.649	7.
	GAPDH - Undetermined												
7	A4				GAPDH	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	NaN		0.486	-0	
8	A5				GAPDH	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	NaN		0.501	0	
9	A6				GAPDH	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	NaN		0.484	0.001	
	Kidney - GAPDH - 24.832844												
10	C1			Kidney	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	24.832844	24.887396	0.059	8.314	7.822	
	Kidney - GAPDH - 24.87947												
11	B8			Kidney	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	24.87947	24.887396	0.059	8.078	7.603	
	Kidney - GAPDH - 24.949875												
12	C2			Kidney	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	24.949875	24.887396	0.059	7.98	7.418	

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de C_T comparativos, fíjese bien si en los grupos de réplicas hay valores atípicos. Si es necesario, quite manualmente los valores atípicos con la tabla de pocillos:

1. En el panel Experiment Menu (Menú de experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Amplification Plot** (Gráfica de amplificación).

   Nota: Si en la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. En la pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación), seleccione **C_T vs Well** (C_T vs pocillo) en el menú desplegable Plot Type (Tipo de gráfica).

3. Seleccione la ficha **View Well Table** (Ver tabla de pocillos).

Notas

4. En la tabla de pocillos:
   a. En el menú desplegable Group By (Agrupar por), seleccione **Replicate** (Réplica).
   b. Fíjese si en el grupo de réplicas hay algún valor atípico (asegúrese de que están marcados).
   c. Active la casilla de verificación **Omit** (Omitir) que hay junto a los pocillos con valores atípicos.
5. Haga clic en **Analyze** (Analizar) para volver a analizar los datos del experimento sin los pocillos con valores atípicos.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la omisión de pocillos para el análisis, acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**. En la ayuda, busque los temas relacionados con la omisión de pocillos:

1. Haga clic en la ficha **Search** (Buscar).
2. Escriba **omit well** (omisión de pocillos).
3. Haga clic en **List Topics** (Ver temas).
4. Haga doble clic en los temas que desee leer.

Revisión de la gráfica multicomponente

La pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) muestra la contribución espectral completa de cada fluorocromo de un pocillo seleccionado durante el tiempo que dura el proceso de PCR.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) hay que fijarse en:

- Fluorocromo ROX™ (referencia pasiva)
- Fluorocromo FAM™ (notificador)
- Picos, depresiones y/o cambios repentinos
- Amplificación en pocillos de control negativo

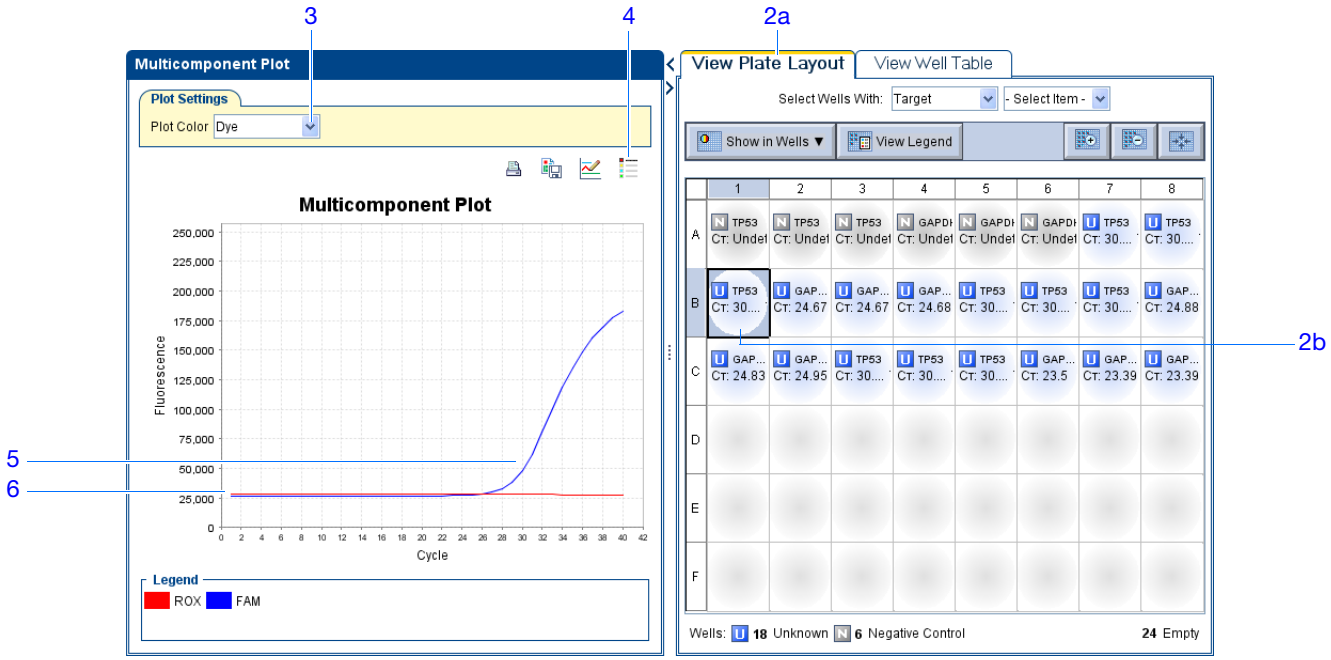
Revisión de la gráfica multicomponente

1. En el panel Experiment Menu (Menú del experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Multicomponent Plot** (Gráfica multicomponente).

Nota: Si en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

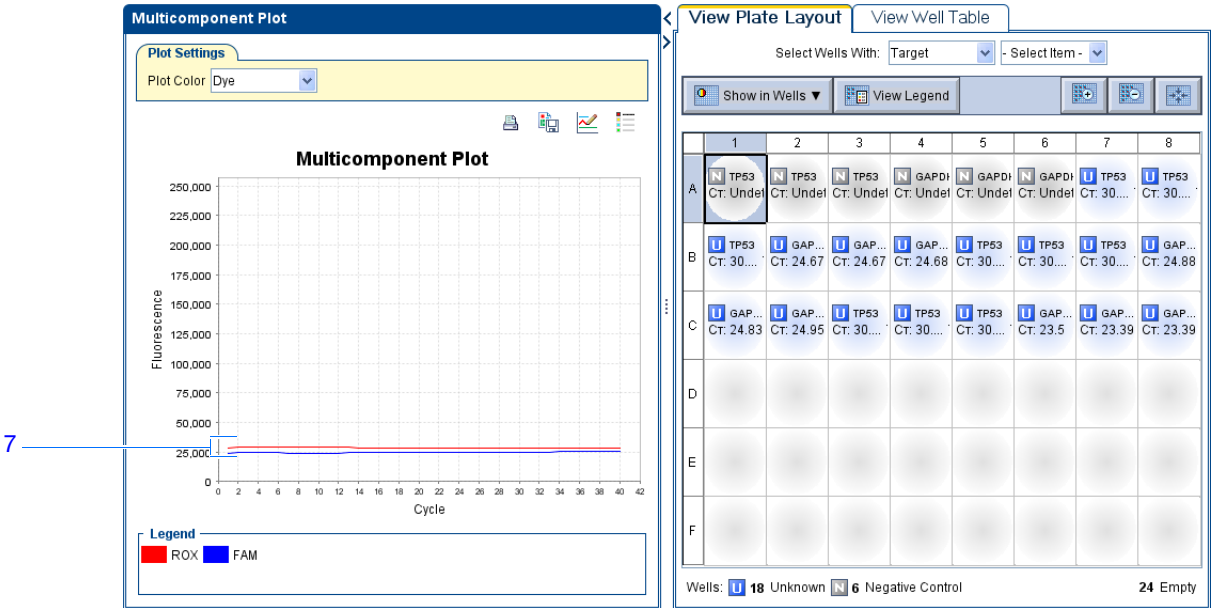
Notas

2. Muestre un solo pocillo a la vez en la pantalla Multicomponente Plot (Gráfica multicomponente):
   a. Haga clic en la ficha **View Plate Layout** (Ver disposición de placa).
   b. Seleccione un pocillo en la disposición de la placa; el pocillo se muestra en la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente).
3. En el menú desplegable Plot Color (Color de gráfica), seleccione **Dye** (Fluorocromo).
4. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).
5. Compruebe la señal del fluorocromo FAM. En el experimento de ejemplo, la señal del fluorocromo FAM aumenta a lo largo de la reacción de PCR, lo que indica que la amplificación es normal.
6. Compruebe la señal del fluorocromo ROX. En el experimento de ejemplo, la señal del fluorocromo ROX permanece constante a lo largo de la reacción de PCR, lo que indica que los datos son típicos.



Notas

7. Seleccione de uno en uno los pocillos de control negativo y compruebe la amplificación. En el experimento de ejemplo, no hay amplificación en los pocillos de control negativo.



Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de C_T comparativos, busque:

- Referencia pasiva: el nivel de fluorescencia del fluorocromo de referencia pasiva debe permanecer relativamente constante a lo largo de la reacción de PCR.
- Fluorocromo del notificador: el nivel de fluorescencia del fluorocromo del notificador debería indicar una región plana que se corresponde con la línea basal, seguida por un rápido aumento en la fluorescencia a medida que la amplificación continúa.
- Cualquier irregularidad de la señal: no debería haber ningún pico, depresión ni cambio súbito en la señal fluorescente.
- Pocillos de control negativo: no debería haber ninguna amplificación en los pocillos de control negativo.

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

Revisión de la gráfica de datos brutos

En la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), se muestra la señal de fluorescencia bruta (no normalizada) para cada filtro óptico de los pocillos seleccionados durante cada ciclo de la PCR a tiempo real.

Acerca del experimento de ejemplo

En el experimento de C_T comparativos de ejemplo, hay que revisar la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) para comprobar si hay un aumento estable de la señal (que no hay ninguna depresión ni cambio abrupto) a partir del filtro apropiado.

Revisión de la gráfica de datos brutos

1. En el panel Experiment Menu (Menú de experimento), seleccione **Analysis** (Análisis) ▸ **Raw Data Plot** (Gráfica de datos brutos).

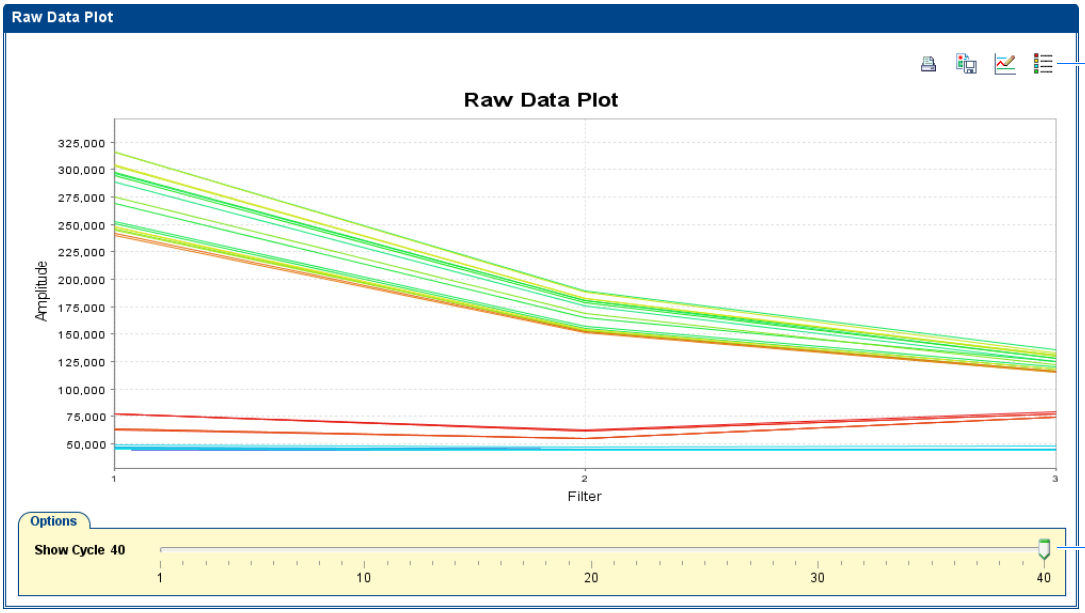
   Nota: Si en la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) no aparece ningún dato, haga clic en **Analyze** (Analizar).

2. Para ver los 48 pocillos en la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), haga clic en la esquina superior izquierda de la disposición de la placa en la ficha View Plate Layout (Ver disposición de placa).

3. Haga clic en **Show/Hide the plot legend** (Mostrar/ocultar la leyenda de la gráfica).

4. Haga clic y arrastre el puntero Show Cycle (Mostrar ciclo) desde el ciclo 1 al 40. En el experimento de ejemplo, hay un aumento estable en la señal a partir del filtro 1, que se corresponde con el filtro del fluorocromo FAM™.

Notas



Los filtros del sistema StepOne™ son:

Filtro	Fluorocromo
1	Fluorocromo FAM™
	Fluorocromo SYBR® Green
2	Fluorocromo JOE™
	Fluorocromo VIC®
3	Fluorocromo ROX™

Directrices de análisis

Cuando analice su propio experimento de C_T comparativos, fíjese en lo siguiente para cada filtro:

- Crecimiento característico de la señal
- Depresiones o cambios abruptos

Para obtener más información

Para obtener más información acerca de la pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos), acceda a la ayuda del software StepOne haciendo clic en o pulsando **F1**.

Notas

A

Flujos de trabajo alternativos para el experimento

Este apéndice cubre los siguientes temas:

- Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) 206
- Flujo de trabajo QuickStart (Inicio rápido) 207
- Flujo de trabajo de molde 208
- Flujo de trabajo de exportación/importación 209

Nota: Para obtener más información acerca de alguno de los temas que se explican en esta guía, acceda a la ayuda desde Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software pulsando **F1**, haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

Notas

Flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada)

Si crea un experimento de curva estándar relativa o C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) con el flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) del software StepOne™, puede configurar el experimento de acuerdo con su criterio.

1. Configure un nuevo experimento:
   a. Haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
   b. En la columna Set Up (Configurar), haga clic en **Advanced Setup** (Configuración avanzada).
   c. En el panel de navegación, haga clic en **Experiment Properties** (Propiedades del experimento) (predeterminado) y, a continuación, escriba las propiedades del experimento de ejemplo.
   d. En el panel de navegación, haga clic en **Plate Setup** (Configuración de placa) y, a continuación, asigne los genes diana, los estándares (sólo en experimentos de curva estándar relativa) y las muestras.
   e. En el panel de navegación, haga clic en **Run Method** (Protocolo de termociclado) y, a continuación, escriba el volumen de la reacción y cambie el perfil térmico según convenga
   f. En el panel de navegación, haga clic en **Reaction Setup** (Configuración de reacción) y, a continuación, revise los volúmenes calculados para las reacciones de PCR, la dilución seriada (sólo en experimentos de curva estándar relativa) y las diluciones de las muestras. Edítelos si es preciso.
   g. (Opcional) En el panel de navegación, haga clic en **Materials List** (Lista de materiales) y, a continuación, seleccione y compre los materiales que necesite para el experimento.
2. Prepare las reacciones de PCR:
   a. Prepare el molde.
   b. Prepare las diluciones de las muestras.
   c. Prepare la dilución seriada (sólo en experimentos de curva estándar relativa).
   d. Prepare la mezcla de reacción.
   e. Prepare la placa de reacción.

Notas

3. Realice el experimento:
   a. Cargue el instrumento.
   b. Inicie el proceso
   c. Descargue el instrumento.
4. Analice los datos.

Flujo de trabajo QuickStart (Inicio rápido)

Si crea un experimento de curva estándar relativa o C_T comparativos con el flujo de trabajo QuickStart (Inicio rápido), puede procesar las reacciones en el instrumento sin ninguna información sobre la configuración de la placa.

1. Prepare las reacciones de PCR:
   a. Prepare el molde.
   b. Prepare las diluciones de las muestras.
   c. Prepare la dilución seriada (sólo en experimentos de curva estándar relativa).
   d. Prepare la mezcla de reacción.
   e. Prepare la placa de reacción.
2. Inicie rápidamente el experimento:
   a. Haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
   b. En la pantalla Run (Proceso), haga clic en **QuickStart** (Inicio rápido).
   c. Seleccione la ficha **Experiment Properties** (Propiedades del experimento) y, a continuación, escriba las propiedades del experimento.
   d. Seleccione la ficha **Run Method** (Protocolo de termociclado) y, a continuación, escriba el volumen de la reacción y cambie el perfil térmico según convenga
3. Realice el experimento:
   a. Cargue el instrumento.
   b. Inicie el proceso.
   c. Descargue el instrumento.
4. Complete la configuración de la placa.
5. Analice los datos.

Notas

Flujo de trabajo de molde

Si crea un molde para un experimento de curva estándar relativa o C_T comparativos, puede configurar muchos experimentos con la misma información de configuración.

1. Cree un molde:
   a. Haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
   b. Abra un experimento existente o cree uno nuevo tal y como se describe en el Capítulo 2 o Capítulo 6.
   c. Seleccione **File** (Archivo) ▸ **Save As Template** (Guardar como molde).
   d. En el cuadro de diálogo Save As Template (Guardar como molde), escriba un nombre de archivo y, a continuación, haga clic en **Save** (Guardar) para guardar el molde.
   e. Haga clic en **Close** (Cerrar).
2. Cree un experimento utilizando el molde:
   a. Si aún no está en la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Home** (Inicio).
   b. En la columna Set Up (Configurar), haga clic en **Template** (Molde).
   c. En el cuadro de diálogo Open (Abrir), seleccione el molde que ha creado en el paso 1.
   d. Modifique el experimento con las herramientas del flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada).
   e. Haga clic en **Save** (Guardar), escriba un nombre de archivo y, a continuación, haga clic en **Save** (Guardar) para guardar el experimento.
3. Prepare las reacciones de PCR:
   a. Prepare el molde.
   b. Prepare las diluciones de las muestras.
   c. Prepare la dilución seriada (sólo en experimentos de curva estándar relativa).
   d. Prepare la mezcla de reacción.
   e. Prepare la placa de reacción.

Notas

4. Realice el experimento:
   a. Cargue el instrumento.
   b. Inicie el proceso.
   c. Descargue el instrumento.
5. Analice los datos.

Flujo de trabajo de exportación/importación

Si crea un experimento de curva estándar relativa o C_T comparativos con el flujo de trabajo de exportación/importación, puede configurar un experimento nuevo con los datos exportados desde otros experimentos.

1. Haga doble clic en (acceso directo al software StepOne) o seleccione **Start** (Inicio) ▸ **All Programs** (Todos los programas) ▸ **Applied Biosystems** ▸ **StepOne** ▸ **StepOne v2.0**.
2. Abra un experimento existente o cree uno nuevo tal y como se describe en el Capítulo 2 o el Capítulo 6.
3. Mientras el experimento está abierto, exporte la información de configuración:
   a. Seleccione **File** (Archivo) ▸ **Export** (Exportar).
   b. En la ficha Export Properties (Propiedades de exportación), seleccione **Setup** (Configuración).
   c. Seleccione **One File** (Un archivo) en el menú desplegable.
   d. Seleccione **(*.txt)** en el menú desplegable File Type (Tipo de archivo).
   e. Seleccione **Open file(s) when export is complete** (Abrir archivos cuando termine la exportación).
   f. Haga clic en **Start Export** (Iniciar exportación) y, a continuación, haga clic en **Close Export Tool** (Cerrar herramienta de exportación) cuando se le solicite.

Notas

4. Utilice el archivo exportado como molde y cree la configuración de placa deseada:
   a. Con una aplicación de hojas de cálculo (por ejemplo, el software Microsoft® Excel), abra el archivo de texto exportado.
   b. Sustituya los parámetros del archivo de texto según convenga Cuando haya terminado, guarde el archivo en un formato de texto delimitado por tabuladores.

   ¡IMPORTANTE! El archivo de texto debe tener el formato correspondiente al formato de la disposición de la placa del software StepOne. Para obtener más información acerca del formato de disposición de la placa, acceda a la ayuda haciendo clic en en la barra de herramientas o seleccionando **Help** (Ayuda) ▸ **StepOne Help** (Ayuda de StepOne).

5. Si aún no está en la pantalla Home (Inicio), haga clic en **Home** (Inicio).
6. En la columna Set Up (Configurar), haga clic en **Advanced Setup** (Configuración avanzada).
7. Información de configuración de la importación:
   a. Seleccione **File** (Archivo) ▸ **Import** (Importar).
   b. Haga clic en **Browse** (Examinar), seleccione el archivo *.txt que ha creado en el paso 4 y, a continuación, haga clic en **Select** (Seleccionar).
   c. Haga clic en **Start Import** (Iniciar importación).
8. Prepare las reacciones de PCR:
   a. Prepare el molde.
   b. Prepare las diluciones de las muestras.
   c. Prepare la dilución seriada (sólo en experimentos de curva estándar relativa).
   d. Prepare la mezcla de reacción.
   e. Prepare la placa de reacción.
9. Realice el experimento:
   a. Cargue el instrumento.
   b. Inicie el proceso.
   c. Descargue el instrumento.
10. Analice los datos.

Notas

Bibliografía

Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F.*, et al.* 1985. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

Glosario

AIF Abreviatura de archivo de información de ensayo (Assay Information File).

alelo Para unun gen dianaa diana determinado, cualquiera de las diferentes secuencias que aparecen en la población.

amplicón Segmento de DNA amplificado durante la PCR.

amplificación Etapa del protocolo de termociclado, durante el cual se produce la generación del amplicón. En los experimentos de cuantificación, los datos de fluorescencia recogidos durante la amplificación se muestran en una gráfica de amplificación y se utilizan para calcular los resultados. Si la amplificación está incluida en el proceso del instrumento StepOne™ para experimentos de genotipado o presencia/ausencia, los datos de fluorescencia recogidos durante la amplificación se muestran en una gráfica de amplificación y se pueden utilizar para solucionar problemas.

apantallador Molécula unida al extremo de 3′ de las sondas TaqMan® para evitar que el notificador emita una señal de fluorescencia mientras la sonda está intacta. Con los reactivos TaqMan®, se puede utilizar un apantallador no fluorescente de unión al surco menor de la doble hélice del DNA (NFQ-MGB). Con reactivos SYBR Green, no se utiliza ningún apantallador.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.

---

apantallador no fluorescente de unión al surco menor de cadena de DNA (NFQ-MGB) Moléculas que están unidas al extremo de 3′ de las sondas TaqMan®. Si la sonda está intacta, el apantallador no fluorescente (NFQ) evita que el fluorocromo del notificador emita una señal de fluorescencia. Dado que el NFQ no emite ninguna fluorescencia, produce señales de fondo más bajas, lo que se deriva en una mayor precisión en la cuantificación. El ligando de unión de surco menor (MGB) aumenta la temperatura de desnaturalización (Tm) sin aumentar la longitud de la sonda. También permite el diseño de sondas más cortas.

archivo de información de ensayo (AIF) Archivo de datos del CD que se incluye con cada pedido de ensayo. El nombre de archivo incluye el número del código de barras de la placa. La información del AIF se incluye en un formato delimitado por tabuladores.

asistente de diseño Función del software StepOne™ que le ayuda a configurar el experimento guiándole a través de los procedimientos óptimos para comenzar el diseño del experimento.

DNA de muestra (10×) Componente de reacción que se muestra en la pantalla Reaction Setup (Configuración de la reacción). El software asume que el DNA de muestra que se añade a la mezcla de reacción está en una concentración del 10×. Por ejemplo, si el volumen de la reacción es de 20 µL, el volumen calculado de la muestra de la reacción 1 es 2 µL.

AutoΔ Opción para aumentar o reducir la temperatura y/o el tiempo en los ciclos subsiguientes de la reacción de PCR. Cuando AutoΔ está habilitado, las opciones se indican por medio de un icono en el perfil térmico:

- AutoΔ activado: ▲
- AutoΔ desactivado: ▲

biblioteca de ensayos SNP Recogida de ensayos SNP en el software StepOne™.

biblioteca de genes diana Recogida de genes diana en el software StepOne™.

biblioteca de muestras Recogida de las muestras en el software StepOne™. La biblioteca de muestras contiene el nombre de la muestra y el color de la muestra.

calibración espacial Tipo de calibración del sistema StepOne™ en el que el sistema asigna las posiciones de los pocillos en el bloque. Los datos de la calibración espacial se utilizan para que el software pueda asociar aumentos de la fluorescencia durante una reacción con pocillos específicos de la placa de reacción.

calibrador Véase muestra de referencia.

cantidad En los experimentos de cuantificación, la cantidad de gen diana en las muestras. La cantidad absoluta puede referirse al número de copias, la masa, la molaridad o la carga viral. La cantidad relativa se refiere a la diferencia entre la cantidad de gen diana normalizada en la muestra y la cantidad de gen diana normalizada en la muestra de referencia.

cantidad estándar Cantidad conocida de la reacción de PCR.

- En los experimentos de curva estándar, la muestra de concentración conocida de gen diana. Las unidades de la cantidad estándar pueden ser la masa, el número de copias, la carga viral u otras unidades para medir la cantidad del gen diana.
- En los experimentos de curvas estándar relativas, la muestra de concentración conocida en el estándar. Por ejemplo, la cantidad estándar puede referirse a la cantidad de cDNA o la cantidad de solución de partida. Las unidades no son relevantes en los experimentos de curvas estándar relativas, porque se compensan o simplifican en los cálculos.

cantidad inicial Cuando se define una curva estándar o una dilución seriada, se corresponde con la cantidad mayor o menor de partida.

cantidad normalizada Cantidad de gen diana dividida por la cantidad de control endógeno.

cebador directo Oligonucleótido que flanquea el extremo de 5′ del gen diana. El cebador reverso y el cebador directo se utilizan juntos en las reacciones de PCR para amplificar el gen diana.

cebador reverso Oligonucleótido que flanquea el extremo de 3′ del gen diana. El cebador reverso y el cebador directo se utilizan juntos en las reacciones de PCR para amplificar el gen diana.

ciclo umbral (C_T) Número del ciclo de la PCR en el que ΔR_n corta el umbral en la gráfica de amplificación.

coeficientes de regresión Valores calculados a partir de la línea de regresión de las curvas estándar, incluido el valor R^2, la pendiente y el punto de intersección y. Los valores del coeficiente de regresión se pueden utilizar para evaluar la calidad de los resultados a partir de los estándares. Véase también curva estándar.

color de gen diana Color asignado a un gen diana para identificarlo en la disposición de la placa y las gráficas de análisis.

Concentración de muestra diluida (10X para la mezcla de reacción) Campo del software que aparece en la ficha Sample Dilution Calculations (Cálculos de dilución de las muestras) de la pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción). En este campo, escriba la concentración de la muestra que desea utilizar para añadir a la mezcla de reacción de todas las muestras del experimento. "10× for Reaction Mix" (10X para la mezcla de reacción) significa que el software asume que la muestra o el componente estándar de la mezcla de reacción tiene una concentración del 10×. Por ejemplo, si la concentración de las muestras diluidas es 50,0 ng/µL (10×), la concentración de la muestra final de la reacción es 5 ng/µL (1×).

configuración avanzada Función del software StepOne™ que permite configurar el experimento de acuerdo con el diseño de dicho experimento.

control endógeno Diana que debería tener un nivel de expresión similar en todas las muestras que se están probando. Se utiliza en experimentos de curva estándar relativa y C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) para normalizar las señales de fluorescencia del gen diana que se está cuantificando. También se conoce como gen de mantenimiento.

control interno positivo (IPC) En los experimentos de presencia/ausencia, un molde de DNA sintético corto que se añade a las reacciones de PCR. Se puede utilizar el IPC para distinguir los falsos negativos en las reacciones afectadas por los apantalladores de PCR, una configuración incorrecta del ensayo o un fallo del reactivo o del instrumento.

control negativo (NTC) En los experimentos del sistema StepOne™, tarea asignada a los genes diana o los ensayos de SNP en los pocillos que contienen agua o tampones en lugar de un molde de las muestras. En los pocillos de control negativo, no se debería producir ninguna amplificación del gen diana.

control positivo En los experimentos de genotipado, la tarea del ensayo de SNP en pocillos que contienen una muestra con un genotipo conocido.

C_T Abreviatura de ciclo umbral (Threshold Cycle).

C_T automático Opción de análisis en la que el software calcula de manera automática el umbral y la línea basal de la gráfica de amplificación. El software utiliza la línea basal y el umbral para calcular el ciclo umbral (C_T).

C_T manual Opción de análisis en la que se introduce el valor del umbral y se selecciona si se desean utilizar cálculos de línea basal automáticos o manuales. El software utiliza el valor del umbral que se introduce y la línea basal para calcular el ciclo umbral (C_T).

curva de disociación

Visualización de los datos recogidos durante la fase de la curva de disociación. Los picos de la curva de disociación pueden indicar la temperatura de desnaturalización (Tm) del gen diana o pueden identificar la presencia de amplificaciones no específicas. La curva de disociación se puede ver como fluorescencia del notificador normalizado (Rn) y la temperatura o como la derivada de la fluorescencia del notificador normalizada (−Rn′) vs la temperatura.

curva estándar

En los experimentos de curva estándar y curva estándar relativa:

- La línea con un ajuste óptimo que resulta al representar los valores C_T frente a las cantidades conocidas del estándar. Véase también línea de regresión.
- Conjunto de estándares que contiene una serie de cantidades conocidas. Los datos de las reacciones de la curva estándar se utilizan para generar la curva estándar. La curva estándar se define por el número de puntos de la serie, el número de réplicas estándar, la cantidad inicial y el factor de dilución. Véase también dilución seriada del estándar.

delta R_n (ΔR_n)

Abreviatura de notificador normalizado con línea basal corregida (baseline-corrected normalized reporter).

desconocidos

En los experimentos de cuantificación, la tarea del gen diana en pocillos que contienen una muestra con cantidades de gen diana desconocidas.

En los experimentos de genotipado, la tarea del ensayo de SNP en pocillos que contienen una muestra con un genotipo desconocido.

En los experimentos de presencia/ausencia, la tarea del gen diana en pocillos que contienen una muestra en la que no se conoce la presencia del gen diana.

diana

La secuencia de ácido nucleico que se desea amplificar y detectar.

dilución seriada

En los experimentos de curvas estándar y curvas estándar relativas, conjunto de normas que contienen una serie de cantidades conocidas. La dilución seriada se prepara por medio de estándares de dilución en serie. Por ejemplo, la solución de partida estándar se utiliza para preparar el primer punto de dilución, el primer punto de dilución se utiliza para preparar el segundo punto de dilución, etc. Los volúmenes necesarios para preparar una dilución seriada se calculan mediante el número de puntos de dilución, el número de réplicas estándar, la cantidad inicial, el factor de dilución y la concentración del estándar en la solución de partida. Véase también curva estándar.

disolvente

Reactivo utilizado para diluir una muestra o estándar antes de añadirlo a la reacción de PCR. El disolvente puede ser agua o un tampón.

disposición de placa

Ilustración de la rejilla de 6 × 8 pocillos y contenido asignado a la placa de reacción. En el software, puede utilizar la disposición de la placa como una herramienta de selección para asignar el contenido de los pocillos, ver las asignaciones de los pocillos y ver los resultados. La disposición de la placa se muestra en las pantallas Design Wizard (Asistente de diseño), Advanced Setup (Configuración avanzada), de reacción y de análisis. La disposición de la placa se puede imprimir, incluir en un informe, exportar y guardar como una diapositiva para una presentación.

disposición autónoma Disposición del sistema en la que el instrumento StepOne™ *no* está conectado a un ordenador por medio del cable amarillo del sistema StepOne™. En su lugar, se utiliza una unidad USB ( ) para transferir datos entre los componentes del sistema StepOne™. En esta disposición, el instrumento StepOne™ se controla por medio de la pantalla táctil del instrumento.

disposición conectada Disposición del sistema en la que el instrumento StepOne™ está conectado directamente a un ordenador conectado por medio del cable del sistema StepOne™ amarillo. En esta disposición, el instrumento StepOne™ está controlado por medio del software StepOne™ del ordenador conectado.

EFF% Véase eficiencia de amplificación (EFF%).

eficiencia de amplificación (EFF%) Cálculo de la eficiencia de la amplificación de la PCR. La eficiencia de la amplificación se calcula utilizando la pendiente de la línea de regresión de la curva estándar. Una pendiente próxima al −3,3 indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100%. Factores que afectan a la eficiencia de la amplificación:

- **Rango de cantidades estándar:** para obtener medidas de la eficiencia más exactas y precisas, utilice un amplio rango de cantidades estándar, de 5 a 6 órdenes de magnitud (multiplicado por 10^5 a 10^6).
- **Número de réplicas estándar:** para obtener mediciones de la eficiencia más precisas, incluya réplicas para reducir los efectos de las imprecisiones del pipeteo.
- **Apantalladores de la PCR:** los apantalladores de la PCR en la reacción pueden reducir la eficiencia de la amplificación.

ensayo En el sistema StepOne™, reacción de PCR que contiene cebadores para amplificar un gen diana y una sonda para detectar el gen diana amplificado.

mezcla de ensayos Componente de reacción de PCR de los Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays y los TaqMan® SNP Genotyping Assays que consta de cebadores diseñados para amplificar un gen diana y una sonda TaqMan® diseñada para detectar la amplificación del gen diana.

ensayo SNP Se utiliza en los experimentos de genotipado. Es una reacción de PCR que contiene cebadores para amplificar el SNP y dos sondas para detectar diferentes alelos.

ensayos bajo pedido Los ensayos TaqMan® que se fabrican cuando se solicitan. Sólo se envían los ensayos que cumplen las especificaciones de control de calidad de la fabricación.

ensayos en inventario Ensayos TaqMan® fabricados previamente, que cumplen las especificaciones de control de calidad y que se guardan en el inventario.

estándar Muestra que contiene cantidades estándar conocidas. Las reacciones estándar se utilizan en experimentos de cuantificación para generar curvas estándar. Véase también curva estándar y dilución seriada del estándar.

experimento

Se refiere al proceso completo de realización de una reacción con el sistema StepOne™, incluida la configuración, el proceso y el análisis. Tipos de experimentos que se pueden realizar con el sistema StepOne™:

- Cuantificación : curva estándar
- Cuantificación : curva estándar relativa
- Cuantificación: C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$)
- Curva de disociación
- Genotipado
- Presencia/ausencia

experimento de punto final

Experimento en el que los datos de fluorescencia que se recogen en una lectura a punto final se utilizan para calcular resultados para experimentos de genotipado o presencia/ausencia.

factor de dilución

Valor numérico que define la secuencia de cantidades en la curva estándar. El factor de dilución y la cantidad inicial sirven para calcular la cantidad estándar de cada punto de la curva estándar. Por ejemplo, si la curva estándar se define con un factor de dilución de 1:10 o 10, la diferencia entre 2 puntos adyacentes cualquiera en la curva se multiplica por 10.

fase

Componente del perfil térmico. Una fase consta de uno o varios pasos.

fase cíclica

Fase del perfil térmico que se repite. Si la fase cíclica se utiliza para realizar la PCR, se denomina fase de amplificación.

fase de curva de disociación

Fase del perfil térmico con un incremento de temperatura para generar una curva de disociación.

fase de espera

Fase del perfil térmico que incluye uno o varios pasos. Por ejemplo, puede añadir una fase de espera al perfil térmico para activar enzimas, para desactivar enzimas o para incubar una reacción.

fluorocromo del sistema

Fluorocromo fabricado por Applied Biosystems y precalibrado en el sistema StepOne™. Fluorocromos del sistema:

- Fluorocromo FAM™
- Fluorocromo JOE™
- Fluorocromo ROX™
- Fluorocromo SYBR® Green
- Fluorocromo VIC®

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.

fluorocromo personalizado

Fluorocromo que no fabrica Applied Biosystems. Puede utilizar fluorocromos personalizados para realizar experimentos de PCR a tiempo real en el sistema StepOne™. Antes de utilizar fluorocromos personalizados, realice una calibración del fluorocromo personalizado.

¡IMPORTANTE! Applied Biosystems no recomienda el uso del fluorocromo TAMRA™ como notificador o apantallador con el sistema StepOne™.

fluorocromo puro

Reactivo que contiene el fluorocromo fluorescente. Los fluorocromos puros se utilizan para realizar una calibración de fluorocromo puro en el sistema StepOne™. Véase también fluorocromo del sistema.

gen de mantenimiento

Véase control endógeno.

gráfica de amplificación

Visualización de los datos recogidos durante la fase cíclica de la amplificación de la PCR. Se puede ver como:

- Notificador normalizado con línea basal corregida (ΔR_n) frente al ciclo
- Notificador normalizado (R_n) frente al ciclo
- Ciclo umbral (C_T) frente al pocillo

gráfica de datos brutos

Visualización del incremento de la fluorescencia de los pocillos seleccionados de todos los filtros. Muestra el incremento de la fluorescencia de todos los puntos de recogida de datos de la reacción.

gráfica de discriminación de alelos

Visualización de los datos recogidos durante la lectura a punto final. La gráfica de discriminación de alelos es una gráfica de la señal del notificador normalizada procedente de la sonda del alelo 1 que se ha trazado a partir de la señal del notificador normalizada procedente de la sonda del alelo 2.

gráfica de temperatura

Visualización de temperaturas de la muestra, la cubierta del instrumento y el bloque de instrumento durante el proceso del instrumento.

gráfica multicomponente

Visualización de los datos recogidos durante la fase cíclica de la PCR a tiempo real. La gráfica multicomponente muestra la fluorescencia de todos los ciclos de la reacción.

grupo de réplicas

Conjunto de reacciones idénticas de un experimento.

identificador de ensayo

Valor o código asignado por Applied Biosystems a los TaqMan® Gene Expression Assays y los TaqMan® SNP Genotyping Assays.

identificador refSNP

Número que identifica el identificador de agrupamiento de SNP (refSNP) de referencia. Lo genera dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database of Nucleotide Sequence Variation o Base de datos de polimorfismos nucleótidos únicos de variación de secuencia nucleótida). Se puede utilizar para buscar en el almacén de Applied Biosystems un Applied Biosystems SNP Genotyping Assay. También se denomina número rs.

inhibidor del IPC

Reactivo añadido a las reacciones de PCR para bloquear la amplificación del control positivo interno (IPC).

intersección y Coeficiente de regresión calculado a partir de la línea de regresión de la curva estándar. La intersección y indica el ciclo umbral esperado (C_T) para una muestra con una cantidad igual a 1 (por ejemplo, 1 ng/µL).

IPC Abreviatura de control positivo interno (Internal Positive Control). Además, en los experimentos de presencia/ausencia, es la tarea del gen diana de IPC en pocillos que contiene el molde de IPC.

IPC bloqueado En los experimentos de presencia/ausencia, tarea asignada al gen diana de IPC en los pocillos que contienen un agente de bloqueo de IPC en lugar de una muestra. Véase también pocillos de IPC bloqueados por control negativo.

IPC+ Llamada de presencia/ausencia cuando el control interno positivo (IPC) es correcto.

lectura a punto final Se utiliza en los experimentos de genotipado y presencia/ausencia. Es la parte del proceso del instrumento que se produce después de la amplificación. En los experimentos de genotipado, los datos de fluorescencia que se recogen durante la lectura a punto final se muestran en la gráfica de discriminación de alelos y se utilizan para asignar genotipos. En los experimentos de presencia/ausencia, los datos de fluorescencia que se recogen durante la lectura a punto final se muestran en la gráfica de presencia/ausencia, y se utilizan para detectar la presencia o ausencia de la diana.

lectura previa a la PCR Se utiliza en los experimentos de genotipado y presencia/ausencia. Es la parte del proceso del instrumento que se produce antes de la amplificación. Los datos de fluorescencia que se recogen durante la lectura previa a la PCR se utilizan para normalizar los datos de fluorescencia a tiempo final.

línea basal En la gráfica de amplificación, línea ajustada a los niveles de fluorescencia de un rango de ciclos definido. Si se utiliza una opción de análisis de línea basal manual, Applied Biosystems recomienda seleccionar los primeros ciclos de la PCR para determinar la línea basal.

línea basal automática Opción de análisis en la que el software calcula los ciclos inicial y final de la línea basal para la gráfica de amplificación. El software utiliza la línea basal y el umbral para calcular el ciclo umbral (C_T).

línea basal manual Opción de análisis en la que se introducen los ciclos inicial y final de la línea basal para la gráfica de amplificación. El software utiliza la línea basal y el umbral para calcular valores C_T.

línea de regresión En los experimentos de curva estándar y curva estándar relativa, la línea que mejor se ajusta a partir de la curva estándar. Fórmula de la línea de regresión:

$C_T = m\ [\text{registro (Cant)}] + b$

donde m es la pendiente, b es el punto de intersección y, y Cant es la cantidad estándar.

Véase también coeficientes de regresión.

método C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) Método de cuantificación para experimentos de cuantificación. Con el método C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$), se utilizan los resultados de una muestra de referencia y un control endógeno para determinar cantidades relativas de un gen diana en las muestras.

método de cuantificación — En los experimentos de cuantificación, el método que se utiliza para determinar la cantidad de gen diana en las muestras. En los experimentos de cuantificación, hay tres tipos de métodos de cuantificación disponibles: curva estándar, C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$) y curva estándar relativa.

método de curva estándar — Método de cuantificación para experimentos de cuantificación. Con el método de curva estándar, los resultados de los estándares se utilizan para determinar cantidades absolutas de un gen diana en las muestras.

método de la curva estándar relativa — Método de cuantificación para experimentos de cuantificación. Con el método de la curva estándar relativa, se utilizan los resultados de los estándares, una muestra de referencia y un control endógeno para determinar las cantidades relativas de un gen diana en las muestras.

mezcla de cebador — Componente de reacción de PCR que contiene el cebador directo y el cebador reverso diseñados para amplificar el gen diana.

mezcla de cebador/sonda — Componente de reacción de PCR que consta de cebadores diseñados para amplificar el gen diana y una sonda TaqMan® diseñada para detectar la amplificación del gen diana.

mezcla de reacción — Solución que contiene todos los componentes necesarios para procesar la reacción de PCR, excepto el molde (de muestra, estándar o de control).

mezcla de sondas — Componente de reacción de PCR que contiene una sonda TaqMan® diseñada para detectar la amplificación del gen diana.

molde — Tipo de ácido nucleico que se añade a la reacción de PCR. El molde recomendado varía en función del tipo de experimento.

monitorización remota — Función del software que permite ver el estado de un instrumento en red, enviar experimentos al instrumento y descargar experimentos del instrumento en el ordenador.

muestra — El molde que se está amplificando.

muestra de referencia — En experimentos de curva estándar relativa y C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$), la muestra a la que se refieren los resultados cuantitativos relativos. También se denomina calibrador.

Muestra estándar (10×) — Componente de reacción que se muestra en la ficha Reaction Mix Calculations (Cálculos de la muestra de reacción) de la pantalla Reaction Setup (Configuración de la reacción). El software asume que la muestra o el estándar que se añade a la mezcla de reacción está en una concentración del 10×. Por ejemplo, si el volumen de la reacción es de 20 µL, el volumen calculado de la muestra o estándar de la reacción 1 es 2 µL.

nombre de experimento — Introducido durante la configuración del experimento, es el nombre que se utiliza para identificar el experimento. Los nombres de los experimentos no pueden superar los 100 caracteres y no pueden incluir ninguno de los siguientes caracteres: barra inclinada hacia delante (/), barra inclinada hacia atrás (\), signo mayor que (>), signo menor que (<), asterisco (*), signo de interrogación (?), comillas ("), línea vertical (|), dos puntos (:) o punto y coma (;).

notificador — Fluorocromo fluorescente que se utiliza para detectar la amplificación. Si se utilizan reactivos TaqMan®, el fluorocromo del notificador se une al extremo de 5′. Si se utilizan reactivos SYBR® Green, el fluorocromo del notificador es SYBR® Green.

notificador derivado (−Rn′) Se muestra en el eje y de la curva de disociación. La señal del notificador derivado es el opuesto de la primera derivada de la fluorescencia normalizada del notificador.

notificador normalizado (Rn) Señal de fluorescencia que emite el fluorocromo del notificador normalizado a la señal de fluorescencia de la referencia pasiva.

notificador normalizado con línea basal corregida (ΔRn) La magnitud de la señal de fluorescencia normalizada que genera el notificador durante la amplificación de la PCR.

ΔRn = Rn (punto final) − Rn (línea basal), donde Rn = notificador normalizado.

número rs Véase identificador refSNP.

omitir pocillo Acción que se realiza después del análisis para omitir uno o varios pocillos de todos los análisis antes de volver a analizar los datos.

pantalla táctil Visor del instrumento que se toca para controlarlo.

paso Componente del perfil térmico. Los pasos se definen por la temperatura, el tiempo, la rampa y el estado de recogida de datos. En los ciclos, los pasos también se definen por medio del estado AutoΔ.

PCR a tiempo real Proceso de recogida de datos de fluorescencia durante la amplificación de la PCR. Los datos de la PCR a tiempo real sirven para calcular los resultados de los experimentos de cuantificación o para solucionar los problemas de los resultados de los experimentos de genotipado o presencia/ausencia.

pendiente Coeficiente de regresión calculado a partir de la línea de regresión de la curva estándar. La pendiente indica la eficiencia de la amplificación de la PCR para el ensayo. Una pendiente de −3,3 indica una eficiencia de amplificación del 100%. Véase también eficiencia de amplificación (EFF%).

perfil térmico Parte de un protocolo de termociclado que especifica la temperatura, el tiempo, la rampa y los puntos de recogida de datos de todos los pasos y fases del proceso del instrumento.

pocillos de IPC de control negativo En los experimentos de presencia/ausencia, pocillos que contienen un molde de IPC y un tampón o agua en lugar de una muestra en la reacción de PCR. El molde de IPC es lo único que se debería amplificar en los pocillos de IPC de control negativo, porque la reacción no contiene ninguna muestra. Véase también IPC+.

pocillos de IPC de control negativo bloqueado En los experimentos de presencia/ausencia, pocillos que contienen un agente de bloqueo del IPC en lugar de una muestra en la reacción de PCR. No se debería producir ninguna amplificación en los pocillos de IPC de control negativo bloqueado, porque la reacción no contiene ninguna muestra y la amplificación del IPC está bloqueada. También se denomina "sin control de amplificación" (NAC).

protocolo de termociclado Definición del volumen de reacción y el perfil térmico del proceso del instrumento.

punto Un estándar en una curva estándar. La cantidad estándar de cada punto de la curva estándar se calcula en base a la cantidad inicial y el factor de dilución.

QuickStart (Inicio rápido) Función del sistema StepOne™ que permite realizar el experimento sin introducir la información de configuración de la placa.

química Véase reactivos.

rampa La velocidad a la que cambia la temperatura durante el proceso del instrumento. Excepto en el caso del paso de la curva de disociación, la rampa se define como un porcentaje. En el caso del paso de la curva de disociación, la rampa se define como un incremento de la temperatura. En el gráfico del perfil térmico, la rampa se indica por medio de una línea diagonal.

reacción de la muestra/diana Combinación de la muestra y el ensayo diana en una reacción de PCR. En el asistente de diseño, cada reacción de PCR sólo puede contener una muestra y un ensayo diana.

reacción del ensayo SNP/muestra Combinación de la muestra y el ensayo SNP en una reacción de PCR. Cada reacción de PCR sólo puede contener una muestra y un ensayo SNP.

reactivos Los componentes de la reacción de PCR que se está utilizando para amplificar el gen diana y detectar la amplificación. Tipos de reactivos utilizados en el sistema StepOne™:

- Reactivos TaqMan®
- Reactivos SYBR® Green
- Otros reactivos

reactivos SYBR® Green Componente de reacción de PCR que consta de dos cebadores que están diseñados para amplificar el gen diana y el fluorocromo SYBR® Green para detectar DNA de doble cadena.

reactivos TaqMan® Componentes de reacción de PCR que constan de cebadores diseñados para amplificar el gen diana y una sonda TaqMan® diseñada para detectar la amplificación del gen diana.

rechazar pocillo Acción que realiza el software durante el análisis para quitar uno o varios pocillos de un análisis posterior si se aplica un aviso específico al pocillo.

recogida de datos Proceso durante la utilización del instrumento en el que un componente del instrumento detecta datos de fluorescencia en cada pocillo de la placa de reacción. El instrumento transforma la señal en datos electrónicos y los datos se guardan en el archivo del experimento. Los puntos de recogida de datos se indican por medio de un icono en el perfil térmico:

- Recogida de datos activada:
- Recogida de datos desactivada:

referencia pasiva Fluorocromo que produce una señal de fluorescencia. Dado que la señal de referencia pasiva debería ser uniforme en todos los posillos, se utiliza para normalizar la señal del fluorocromo del notificador para justificar las fluctuaciones de fluorescencias causadas por diferencias menores entre pocillos en concentraciones o en volumen. La normalización de la señal de referencia pasiva permite obtener datos de gran precisión.

réplicas Número total de reacciones idénticas que contienen componentes idénticos y volúmenes idénticos.

retrotranscriptasa Componente de reacción de PCR que convierte el RNA en cDNA. La retrotranscriptasa se añade a la reacción de PCR para realizar un RT-PCR de 1 paso.

R_n Abreviatura de notificador normalizado (Normalized Reporter).

serie Véase dilución seriada.

sin control de amplificación (NAC) Véase también pocillos de IPC de control negativo bloqueado.

sin control de molde (NTC) Véase control negativo (NTC).

SNP Abreviatura de polimorfismo de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism). El SNP puede constar de una diferencia base o una indel (inserción/deleción).

tarea Tipo de reacción realizada en el pocillo para el gen diana o el ensayo SNP. Tareas disponibles en los experimentos del sistema StepOne™:

- Desconocida
- Control negativo
- Estándar (experimentos de curvas estándar y curvas estándar relativas)
- Control positivo (experimentos de genotipado)
- IPC (experimentos de presencia/ausencia)
- IPC bloqueado (experimentos de presencia/ausencia)

temperatura de desnaturalización (Tm) Punto en la curva de disociación en el que se produce un pico en los niveles de fluorescencia que sirve para indicar que el DNA de doble cadena amplificado se disocia en DNA de cadena sencilla.

tipo de experimento El tipo de experimento que se realiza con el sistema StepOne™:

- Curva estándar
- C_T comparativos ($\Delta\Delta C_T$)
- Curva estándar relativa
- Curva de disociación (no disponible en el asistente de diseño)
- Genotipado
- Presencia/ausencia

El tipo de experimento que seleccione afecta a las pantallas de configuración, perfil de reacción y análisis.

Tm Abreviatura de temperatura de desnaturalización (Tm o Melting Temperature).

umbral Nivel de fluorescencia por encima de la línea basal y dentro de la región de crecimiento exponencial de la gráfica de amplificación. El umbral se puede determinar automáticamente (véase C_T automático) o se puede ajustar manualmente (véase C_T manual).

umbral del ciclo Véase ciclo umbral (C_T).

valor atípico Para un conjunto de datos, un punto de dato que es significativamente más pequeño o grande que los demás.

valor R^2 Coeficiente de regresión calculado a partir de la línea de regresión de la curva estándar. El valor R^2 indica la proximidad del ajuste entre la línea de regresión de la curva estándar y los puntos de datos C_T individuales de las reacciones estándar. El valor 1,00 indica un ajuste perfecto entre la línea de regresión y los puntos de datos.

velocidad de la rampa Velocidad a la que se produce la rampa de temperatura durante el proceso del instrumento. Las velocidades de rampa disponibles son rápida y estándar.

Índice

A

ADVERTENCIA, descripción xi
analizar experimento
  analizar 94, 176
  directrices 95, 102, 107, 110, 115, 118, 119, 122, 123, 177, 184, 189, 195, 197, 199, 202, 204
  flujo de trabajo 92, 174
  omitir pocillos 118, 197
  para obtener más información 103, 108, 110, 115, 118, 120, 122, 123, 184, 190, 195, 197, 200, 202, 204
  publicar los datos 111, 191
  ver opciones de análisis 114, 194
  ver pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) 103, 185
  ver pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión de genes) 108, 182
  ver pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) 120, 200
  ver pantalla Multiple Plots (Múltiples gráficas) 99, 180
  ver pantalla QC Summary (Resumen QC) 116, 196
  ver pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) 122, 203
  ver pantalla Standard Curve (Curva estándar) 100
  ver tabla de pocillos 108, 182
Applied Biosystems
  asistencia técnica x
  comentarios del cliente acerca de la documentación ix
  contacto x
Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System. Véase sistema StepOne.
asistencia técnica, contacto x
ayuda en línea. *Consulte* Sistema de ayuda

B

biblioteca 34, 142
biblioteca Run Method (Método de proceso) 34, 142

C

cargar placa de reacción 70, 170
categoría de instalación xx
categoría de sobretensión (potencia) xx
comentarios del cliente, acerca de los documentos de Applied Biosystems ix
consejos de desplazamiento
  seleccionar pocillos 98, 179
  ver múltiples gráficas 99, 180
consumibles 21, 130
  admitidos 3
  Véase también materiales necesarios. 3
control endógeno
  componente de experimento 5
  pantalla Relative Quantification Settings (Opciones de cuantificación relativa) 32, 140
  seleccionar 27, 136
control negativo, componente de experimento 5, 6
convenciones utilizadas en esta guía vii
crear nuevo experimento 17, 127

D

datos
  acerca de la recopilación de datos 2
  experimento de ejemplo 9, 12, 94, 176
  publicar 111, 191
  transferir 87
descargar placa de reacción 87
Design Wizard (Asistente de diseño)
  elementos del software 127
  finalizar 46, 152
  pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento) 20, 129
  pantalla Materials List (Lista de materiales) 43, 148
  pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales) 22, 131
  pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción) 35, 142
  pantalla Relative Quantification Settings (Opciones cuantificación relativa) 140
  pantalla Relative Quantification Settings (Opciones de cuantificación relativa) 32
  pantalla Run Method (Método de proceso) 33, 141
  pantalla Samples (Muestras) 30, 137
  pantalla Standards (Estándares) 28
  pantalla Targets (Dianas) 25, 135
dianas
  configurar 25, 135
  directrices de diseño 26, 136
dilución seriada de estándar
  componente de experimento 5
  preparar 55
  volúmenes calculados 36, 39
diluciones de muestras
  preparar 53, 158
  volúmenes calculados 40, 53, 146, 159

directrices
análisis 95, 102, 107, 110, 115, 118, 119, 122, 123, 177, 184, 189, 195, 197, 199, 202, 204
diseño 21, 23, 26, 29, 32, 33, 34, 41, 45, 48, 130, 132, 136, 139, 140, 142, 147, 150, 154
eliminación de residuos químicos xix
preparación 54, 58, 60, 64, 158, 160, 162, 165
proceso 72
seguridad de residuos químicos xix
seguridad química xvii
diseñar experimento
configurar dianas 25, 135
configurar estándares 28
configurar método de proceso 33, 141
configurar muestras 30, 137
configurar opciones cuantificación relativa 140
configurar opciones de cuantificación relativa 32
crear nuevo 17, 127
definir métodos y materiales 22, 131
definir propiedades del experimento 20, 129
directrices 21, 23, 26, 29, 32, 33, 34, 41, 45, 48, 130, 132, 136, 139, 140, 142, 147, 150, 154
elementos del software 127
finalizar flujo de trabajo del asistente de diseño 46, 152
flujo de trabajo 16, 126
para obtener más información 22, 24, 27, 30, 32, 33, 34, 42, 45, 48, 131, 134, 137, 139, 141, 142, 148, 151, 154
revisar configuración de reacción 35, 142
solicitar materiales 43, 148
disposición conectada
inicio 73
supervisión 77
transferir datos 88
distribución autónoma
inicio 74
supervisión 86
supervisión remota 83
transferencia de datos remota 88
transferir datos 89
documentación, relacionada viii

E

eficiencia de amplificación 29, 30, 102, 103
elementos del software
Design Wizard (Asistente de diseño) 127
pantallas de análisis 96, 178
eliminación de residuos, directrices xx
ensayos en inventario 41, 147
ensayos fabricados bajo pedido 41, 147
ensayos personalizados 41, 147
ergonomía, seguridad xxii
estación de trabajo xxii
estándares
casilla de verificación Set Up Standards (Configurar estándares) 25, 26
componente de experimento 5
configurar 28
diluir 55
directrices de diseño 29
EMC xxiii
reacciones estándar 62
seguridad xxiii
estándares de compatibilidad electromagnética. *Consulte*Estándares EMC
estándares de seguridad xxiii
estándares EMC xxiii
etiquetas de seguridad, en instrumentos xiv
experimento de CT comparativo de ejemplo
analizar 174
datos 12
descripción 11
diseño 126
flujo de trabajo 13
nombre 129
preparar 156
proceso 168
experimento de curva estándar relativa de ejemplo
analizar 92
datos 12
descripción 10
diseño 16
flujo de trabajo 13
nombre 20
preparar 50
proceso 68
experimento de DDCT. Véase experimento de CT comparativo
experimentos de CT comparativo
acerca de 5
comparados con experimentos de curva estándar relativa 6
experimentos de curva estándar relativa
acerca de 4
comparados con experimentos de CT comparativo 6

F

flujo de trabajo Advanced Setup (Configuración avanzada) 9, 10, 24, 48, 64, 133, 154, 165, 206
flujo de trabajo de exportación/importación 10, 209
flujo de trabajo de inicio rápido 10, 207
flujo de trabajo de plantilla 10, 208
flujos de trabajo
Advanced Setup (Configuración avanzada) 206
experimento de ejemplo 13
Exportación/importación 10, 209
Plantilla 10, 208
QuickStart (Inicio rápido) 10, 207
flujos de trabajo alternativos del experimento. Véase flujos de trabajo.
formación, información acerca de x

G

gráfica de amplificación, típica 107, 189

H

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 51, 157

I

iconos de peligro. *Consulte* símbolos de peligro, en instrumentos
imprimir instrucciones de la configuración de la reacción 40, 146
indicador BADROX 117, 197
indicador NOAMP 117, 197
indicador NOISE 117, 197
indicador NOSIGNAL 117, 197
indicador OFFSCALE 117, 197
indicador OUTLIERRG 117, 197
indicador SPIKE 117, 197
indicador THOLDFAIL 117, 197
iniciar proceso
  disposición conectada 73
  distribución autónoma 74

L

línea basal
  ajustar manualmente 115, 195
  valores correctos 107, 189

M

marcador AMPNC 117, 197
marcador BLFAIL 117, 197
marcador CTFAIL 117, 197
marcador EXPFAIL 117, 197
marcador HIGHSD 117, 197
marcadores
  en experimentos de CT comparativo 197
  en experimentos de curva estándar relativa 117
  opciones de análisis 115, 195
materiales necesarios 51, 53, 55, 59, 61, 157, 159, 161, 163
mezcla de reacción
  volúmenes 59, 161
  volúmenes calculados 36, 38, 143, 145
movimiento repetitivo, seguridad xxii
movimiento y levantamiento, seguridad xvi
MSDS
  descripción xvii
  obtención xviii
MSDS, obtener x
muestra de referencia
  componente de experimento 5
  pantalla Relative Quantification Settings (Opciones de cuantificación relativa) 32, 140
muestras
  componente de experimento 4, 5
  configurar 30, 137
  diluciones 53, 158
  directrices de diseño 32, 139
  preparar plantilla 51, 157
  reacciones de muestras (desconocidas) 64, 164

O

omitir pocillos 118, 197
opciones de análisis
  avanzadas 115, 195
  CT 115, 195
  cuantificación relativa 115, 195
  línea basal 115, 195
  marcador 115, 195
  umbral 115, 195
  ver 114, 194
opciones de notificación 71
otros reactivos basados en fluorescencia 9

P

palabras de aviso para el usuario, descripción viii
pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación)
  supervisión durante un proceso 78
  ver después de proceso 103, 185
pantalla Experiment Properties (Propiedades de experimento) 20, 129
pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión de genes) 108, 182
pantalla Materials List (Lista de materiales) 43, 148
pantalla Methods & Materials (Métodos y materiales) 22, 131
pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) 120, 200
pantalla Multiple Plots (Múltiples gráficas) 99, 180
pantalla QC Summary (Resumen QC) 116, 196
pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) 122, 203
pantalla Reaction Setup (Configuración de reacción) 35, 142
pantalla Relative Quantification Settings (Opciones cuantificación relativa) 140
pantalla Relative Quantification Settings (Opciones de cuantificación relativa) 32
pantalla Run Method (Método de proceso) 33, 141
  supervisión durante un proceso 81
pantalla Samples (Muestras) 30, 137
pantalla Standards (Estándares) 28
pantalla Targets (Dianas) 25, 135
pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) 80

pantallas de análisis
consejos de desplazamiento 98, 179
elementos del software 96, 178
pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) 103, 185
pantalla Gene Expression Plot (Gráfica de expresión de genes) 108, 182
pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) 120, 200
pantalla Multiple Plots (Múltiples gráficas) 99, 180
pantalla QC Summary (Resumen QC) 116, 196
pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) 122, 203
pantalla Standard Curve (Curva estándar) 100
tabla de pocillos 108, 182
PCR multiplexada 7, 25, 134
PCR uniplexada 7, 25, 134
Peligro xxi
PELIGRO, descripción xi
peligros. *Consulte* seguridad
perfiles de residuos, descripción xx
placa de reacción
cargar 70, 170
descargar 87
disposición 46, 152
preparar 61, 163
plantilla. Véase muestras.
pocillos
control negativo 31, 46, 61, 138, 152, 163
desconocidos 31, 46, 61, 138, 152, 163
estándar 31, 46, 61, 138, 152, 163
omitir 118, 197
seleccionar 98, 179
PRECAUCIÓN, descripción xi
preparar el proceso 69, 169
preparar experimento
dilución seriada de estándar 55
diluciones de muestras 53, 158
directrices 54, 58, 60, 64, 158, 160, 162, 165
flujo de trabajo 50, 156
mezcla de reacción
preparar 58, 160
para obtener más información 52, 54, 60, 65, 158, 160, 162, 165
placa de reacción 61, 163
plantilla 51, 157
publicar datos 111, 191

R

reactivos
otros basados en fluorescencia 9
SYBR Green 8
TaqMan 8
reactivos SYBR Green 8, 23, 24, 27, 41, 123, 132, 134, 136, 147, 204
reactivos TaqMan 8, 23, 24, 27, 41, 123, 132, 134, 136, 147, 204
realizar experimento
activar opciones de notificaciones 71
alertas 82
directrices 72
flujo de trabajo 68
iniciar 73
para obtener más información 71, 82, 84
preparar 69, 169
supervisar 76
transferir datos 87
réplica, componente de experimento 5, 6
residuos biológicos peligrosos, manipulación xx
residuos radioactivos, manipulación xx
resultados, interpretar 93, 175
RT-PCR de 1 pasos 7, 24, 25, 34, 41, 133, 134, 142, 147
RT-PCR de 2 pasos 7, 11, 12, 24, 25, 133, 134

S

seguridad
antes de usar el instrumento xvi
convenciones xi
directrices xvii, xix, xx
eléctrica xx
ergonomía xxii
estación de trabajo xxii
estándares xxiii
mover y levantar el instrumento xvi
mover/levantar xvi
movimiento repetitivo xxii
peligros biológicos xxi
química xvii
residuo químico
residuos químicos xix
uso del instrumento xvi
seguridad de residuos químicos xix
seguridad eléctrica xx
seguridad química xvii
seleccionar pocillos 98, 179
símbolos de peligro. *Consulte* símbolos de peligro, en instrumentos
símbolos de peligro. *Consulte* símbolos de seguridad, en instrumentos
símbolos de seguridad, en instrumentos xiii
símbolos, seguridad xiii
sistema de ayuda, acceso ix
sistema StepOne
consumibles 3
distribuciones 73, 76, 88
filtros 123, 204
reactivos 8
recopilación de datos 2
solicitar materiales 43, 148

solución de problemas
ajustar línea basal 115, 195
ajustar umbral 115, 195
marcadores 117, 197
omitir pocillos 118, 197
ver opciones de análisis 114, 194
ver pantalla Multicomponent Plot (Gráfica multicomponente) 120, 200
ver pantalla QC Summary (Resumen QC) 116, 196
ver pantalla Raw Data Plot (Gráfica de datos brutos) 122, 203
supervisar proceso
disposición conectada 77
distribución autónoma 86
distribución autónoma (remota) 83
pantalla Amplification Plot (Gráfica de amplificación) 78
pantalla Run Method (Método de proceso) 81
pantalla Temperature Plot (Gráfica de temperatura) 80
suposiciones de uso de esta guía vii

T

tabla de pocillos 108, 182
transferir datos 87

U

umbral
ajustar manualmente 115, 195
valores correctos 107, 189
usar esta guía
como tutorial 9
con sus propios experimentos 9
uso del instrumento, seguridad xvi

V

valores atípicos. Véase omitir pocillos.
velocidad de la rampa 22, 24, 131, 133

Worldwide Sales and Support

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at **www.appliedbiosystems.com**.

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

Headquarters
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404 USA
Phone: +1 650.638.5800
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224
Fax: +1 650.638.5884

06/2010

Applied Biosystems

Número de referencia 4377742 Rev. B